

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



VALIDACIÓN DE UNA PCR DUPLEX PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE
PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR GARRAPATA EN NUEVO LEÓN.

POR

QBP. HÉCTOR EDUARDO DÁVILA VENEGAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



VALIDACIÓN DE UNA PCR DUPLEX PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE
PATÓGENOS TRASMITIDOS POR GARRAPATA EN NUEVO LEÓN.

Aprobación de tesis por el comité particular de

QBP. Héctor Eduardo Dávila Venegas

Dirección de Tesis

Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Director

Dr. Jorge Lara Arias
Director Externo

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez
Co-Asesor

Dra. Diana Eliza Zamora Ávila
Co-Asesor

AGRADECIMIENTOS

A Dios que de alguna manera hace todo posible.

A mis padres que me apoyan incondicionalmente.

Al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño, mentor, director de tesis, pero sobre todo mi amigo. Fue un placer entrar al ruedo nuevamente en esta aventura. Gracias por todas las enseñanzas, los consejos, las pláticas y sobre todo por la confianza.

A los Doctores Jorge Lara Arias, Ramiro Avalos Ramírez, Diana Elisa Zamora. Gracias por las cátedras dentro del aula dentro de mi formación académica, Gracias por la disposición, revisiones y sus atenciones. Espero no haber dado mucha lata.

A los Laboratorios Helica Diagnostics por permitirme usar sus instalaciones y equipos, por la hospitalidad, amabilidad y disposición de su gente.

Al CONACYT por el apoyo económico durante mi tiempo como estudiante de Maestría.

A mis compañeros de generación “Fernando, Gloria, Saul y Valeria” gracias por esos momentos de risa en el salón de clases, las convivencias y sobre todo el soporte uno a uno para poder terminar todos nuestro trabajo. Gracias, amigos.

A los MVZ Raymundo Pérez y Argelia Holguín, bien dice el dicho “Dios los cría y ellos se juntan” Los recuerdos de las vivencias que tenemos serán cosa de nunca olvidar. La FMVZ me deja más que un título de Master, me deja grandes amigos. Gracias por todo.

A mis amigos del Bacter Lab, (los QBP. Sandra y Maicol y los MVZ. Arturo, Liz, Michele, Larissa) la convivencia con ustedes definitivamente me alegraba el día, gracias por aparecerse en mi vida.

A todo el personal operativo y docente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, gracias por su amabilidad y hospitalidad.

DEDICATORIA

Para ti Alejandra, por todo tu tiempo, por todo el soporte, y sobre todo por todo tu amor. Mi paso por la FMVZ me deja muchas cosas y aun así sigo priorizando como la más valiosa que me dio la oportunidad de Coincidir contigo.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	ANTECEDENTES.....	5
4.1	Vectores de transmisión.....	5
4.2	Distribución geográfica.....	7
4.3	Prevalencia en México.....	7
4.4	Hemoparásitos de estudio.....	9
4.4.1	<i>Babesia</i>	9
4.4.1.1	Taxonomía.....	9
4.4.1.2	Morfología.....	10
4.4.1.3	Patogenia.....	10
4.4.1.4	Signos clínicos.....	11
4.4.1.5	Diagnostico.....	11
4.4.1.6	Tratamiento.....	12
4.4.2	<i>Ehrlichia</i>	13
4.4.2.1	Taxonomía.....	13
4.4.2.2	Morfología.....	14
4.4.2.3	Patogenia.....	14
4.4.2.4	Signos Clínicos.....	14
4.4.2.5	Diagnostico.....	15
4.4.2.6	Tratamiento.....	16
4.5.	Métodos de Detección.....	16
4.5.1	Serológicos.....	16
4.5.1.1	ELISA.....	16
4.5.1.2	IC.....	17
4.5.2	Moleculares.....	17
4.5.2.1	PCR punto final.....	17
4.5.2.2	Multiplex.....	17
5	JUSTIFICACION.....	18

6	HIPOTESIS	19
7	OBJETIVO GENERAL	20
8	OBJETIVO ESPECIFICO	20
9	MATERIALES Y METODOS	21
	❖ Muestreo.....	21
	❖ Identificación de Garrapatas.....	22
	❖ Extracción de DNA Genómico	23
	❖ Cuantificación de DNA Genómico	24
	❖ Búsqueda de controles positivos	25
	❖ Secuenciación de controles	26
	❖ Estandarización de la PCR Multiplex	28
	❖ Diseño Experimental	29
10	RESULTADOS.....	30
	✓ Muestreo e identificación.....	30
	✓ Extracción y Cuantificación de DNA.....	31
	✓ Controles individuales y Secuenciación.....	32
	✓ Estandarización de la PCR.....	34
	✓ Frecuencia de aparición de patógenos.....	36
	✓ Diseño estadístico.....	41
11	DISCUSION	42
12	CONCLUSION	44
13	PERSPECTIVAS	45
14	BLIBLIOGRAFIAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Clasificación taxonómica del microorganismo *Babesia*.
- Tabla 2. Clasificación taxonómica del microorganismo *Ehrlichia*.
- Tabla 3. Juego de primers utilizados para la amplificación del hemoparásito *Ehrlichia*.
- Tabla 4. Juego de primers utilizados para la amplificación del hemoparásito *Babesia*.
- Tabla 5. Condiciones para la amplificación de muestras a secuenciar.
- Tabla 6. Protocolo de PCR para amplificación de productos para secuenciar.
- Tabla 7. Componentes constitutivos de la PCR múltiple.
- Tabla 8. Protocolo para PCR múltiple.
- Tabla 9. Resultados prueba estadística de chi-cuadrada con tablas de contingencia.

ÍNDICE DE GRAFICAS

- Grafica 1. Distribución de las muestras en los municipios del área metropolitana de Nuevo León, N total de 400.
- Grafica 2. Distribución de los géneros obtenidos en el muestreo.
- Grafica 3. Porcentaje de mayor frecuencia de aparición de los patógenos en los municipios.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de 3 hospedadores. CDC, 2018 (Modificado)

Figura 2. Bacterias presentes en el microbioma de las Garrapatas. Glándulas Salivales (SG), Intestinos (MG), Ovarios (Ov) y tubulos de Malpighi (Mp). (Narasimhan, 2015)

Figura 3. Distribución Geográfica del Estado de Nuevo León y su área Metropolitana.

Figura 4. Observación e Identificación de Garrapatas.

Figura 5. Garrapatas bajo observación en el estereoscopio para su identificación.

Figura 6. Proceso General para la obtención de DNA Genómico a partir de muestras de Garrapatas.

Figura 7. Equipo secuenciador SeqStudio™ by Applied Biosystems™

Figura 8. Cuantificación de DNA por el equipo NanoDrop. Se observa el pico de absorbancia a una longitud de onda de (240-260 nm)

Figura 9. Controles positivos individuales para *Ehrlichia* (480pb) y *Babesia* (220 pb)

Figura 10. Secuenciación para determinar los controles positivos

Figura 11. Análisis BLAST para las secuencias de los controles de *Ehrlichia*.

Figura 12. Análisis BLAST para las secuencias de los controles de *Babesia*.

Figura 13. Gradiente de temperaturas para determinar la Tm optima de la reacción

Figura 14. Determinación de la sensibilidad de la prueba de PCR multiplex

1. RESUMEN

Actualmente la detección de microorganismos patógenos que afectan tanto la salud pública como veterinaria es de gran importancia. Dicha importancia recae en la capacidad de determinar con un alto grado de confiabilidad a los agentes patógenos capaces de causar distintos padecimientos en animales y así mismo con una posible transmisión a humanos. El poseer las adecuadas herramientas de detección permite lograr un diagnóstico confiable con el cual será posible determinar un tratamiento específico y efectivo.

En la presente investigación se pretendió validar y estandarizar un diseño molecular múltiple con la cual se determinará la presencia de los microorganismos patógenos *Ehrlichia spp*, *Babesia spp*, a partir de muestras de garrapatas las cuales fueron recolectadas en distintos centros de control canino de la zona metropolitana del estado de Nuevo León. Con los resultados obtenidos se observó que existe una frecuencia de aparición de ambos patógenos dentro del área metropolitana de Nuevo León, y se logró concluir que el diseño molecular múltiple funciona como una herramienta de detección fiable de los hemoparásitos de interés.

2. ABSTRACT

Currently, the detection of pathogenic microorganisms that affect both public and veterinary health is of great importance. This importance lies in the ability to determine with a high degree of reliability the pathogens capable of causing different diseases in animals and also with a possible transmission to humans. Possessing the appropriate screening tools allows a reliable diagnosis to be made from which a specific and effective treatment will be derived.

In the present investigation, the validity and standardization of a multiple molecular design was intended to be used to determine the presence of the pathogenic microorganisms *Ehrlichia* spp, *Babesia* spp, from tick samples which were collected in different canine control centers in the metropolitan area. of the state of Nuevo León. With the results obtained, it was observed that there is a frequency of appearance of both pathogens within the metropolitan area of Nuevo León, and it was possible to conclude that the multiple molecular design works as a reliable detection tool for the hemoparasites of interest.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores representan un grupo generalizado de padecimientos que son ocasionados por una gran gama de artrópodos entre los que destacan mosquitos, garrapatas, chinches entre otros. Estos padecimientos son de gran interés público y veterinario debido a la gran cantidad de agentes infecciosos los cuales pueden ser transmitidos por los vectores artrópodos, causando enfermedades en animales silvestres y domésticos y con potencial zoonótico de infectar al ser humano (Dantas-Torres, 2015).

Las garrapatas son ectoparásitos obligados hematófagos los cuales en su ciclo vital se alimentan de distintos hospedadores lo cual las vuelve un trasmisor importante de patógenos. Los perros además de tener la susceptibilidad de poder ser infectados por garrapatas cumplen un papel importante en el ciclo biológico de éstas, siendo hospederos definitivos y reservorios, lo cual los convierte en un transporte mecánico siendo un importante indicador de riesgo epidemiológico (Betancourt, 1996; Rocha *et al.*, 2019).

Diversas organizaciones mundiales como la Organización Mundial de la Salud estipulan que las garrapatas ocupan el segundo peldaño dentro de los vectores transmisores de patógenos que provocan complicaciones en animales y humanos. El primer lugar es ocupado por los mosquitos (Beugnet & Marie, 2009; OMS, 2019).

Como menciona Parra y colaboradores (1999) “entre las principales enfermedades transmitidas por garrapatas a humanos y animales se encuentran: Enfermedad de Lyme, Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Rickettsiosis, Babesiosis entre otras”.

En el caso de los hemoparásitos, cuando estos causan una infección en humanos los síntomas suelen presentarse de manera inespecífica en donde suele predominar la anemia acompañada de las denominadas fiebres fluctuantes. En animales dependiendo de la etapa de la enfermedad, pueden llegar a ser muy parecidos, por lo que el médico veterinario debe solicitar varias pruebas para tener un diagnóstico preciso y actuar en consecuencia.

En la práctica de la medicina veterinaria clínica, los signos y el historial clínicos del paciente ayudan a determinar qué tipo de terapéutica utilizar, sin embargo, es común realizar un diagnóstico mediante una prueba rápida basada en serología, siempre y cuando la

signología del paciente así lo requiera. Sin embargo, una vez aplicado el tratamiento, el médico veterinario se enfrenta al reto de determinar si su paciente ha eliminado o no al agente patógeno, por lo que es común realizar de nuevo una prueba serológica que muy probablemente, al detectar anticuerpos, arroje un resultado positivo, existiendo la posibilidad de que el tratamiento haya sido exitoso y ya no se encuentre circulando al agente causal. Para solventar este problema, existe el diagnóstico molecular por técnicas como la PCR que amplifican una región específica del genoma del microorganismo, por lo que se considera como una prueba confirmatoria.

Una posible alternativa para la reducción de costos sería el disponer de una prueba capaz de detectar a varios hemoparásitos en un solo evento, en la cual se pueden analizar de manera simultánea diferentes secuencias moleculares.

En el presente estudio se pretende estandarizar las condiciones para el uso de un método molecular que permita determinar la presencia múltiple de patógenos hemoparásitos transmitidos por garrapatas y así mismo determinar su nivel de prevalencia en las zonas de colecta.

4. ANTECEDENTES

4.1 Vectores de transmisión

Se conoce que las garrapatas son trasmisoras de una amplia gama de patógenos, lo cual las posiciona como el segundo artrópodo que transmite más patógenos a nivel mundial, solo por debajo de los mosquitos. Se describen como ectoparásitos, hematófagos que son un reservorio o vector de distintos patógenos entre los que destacan protozoarios, hongos, bacterias y virus. Estos patógenos son transmitidos durante el proceso de alimentación de la garrapata donde su saliva es la vía principal del acceso al torrente sanguíneo del hospedero (Brites-Neto *et al.*, 2015).

Se conocen 2 grandes familias de garrapatas, la compuesta por la familia *Argasidae* o también llamadas garrapatas blandas que comprenden los géneros *Argas*, *Antricola*, *Ornithodoros*, *Nothoaspis*, *Otobius*. Y la familia *Ixodidae* o garrapatas duras que comprenden los géneros *Ixodes*, *Amblyoma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus* (Pérez *et al.*, 2014).

Los miembros de la familia *Argasidae*, comparten un ciclo biológico que involucra varios huéspedes intermediarios hasta posicionarse en el huésped definitivo. El apareamiento ocurre fuera del huésped y existen varias oviposiciones entre tomas de sangre en cada hospedero (Brites-Neto, 2015).

Los miembros de la familia *Ixodidae* presentan un marcado dimorfismo sexual, su ciclo biológico comprende el parasitismo de varios huéspedes intermediarios hasta llegar a un huésped definitivo. Algunas etapas de este ciclo se dan en el medio ambiente lo cual lo hace un factor de riesgo para infectar a otros animales e incluso el ser humano (Figura 1) (Brites-Neto, 2015).

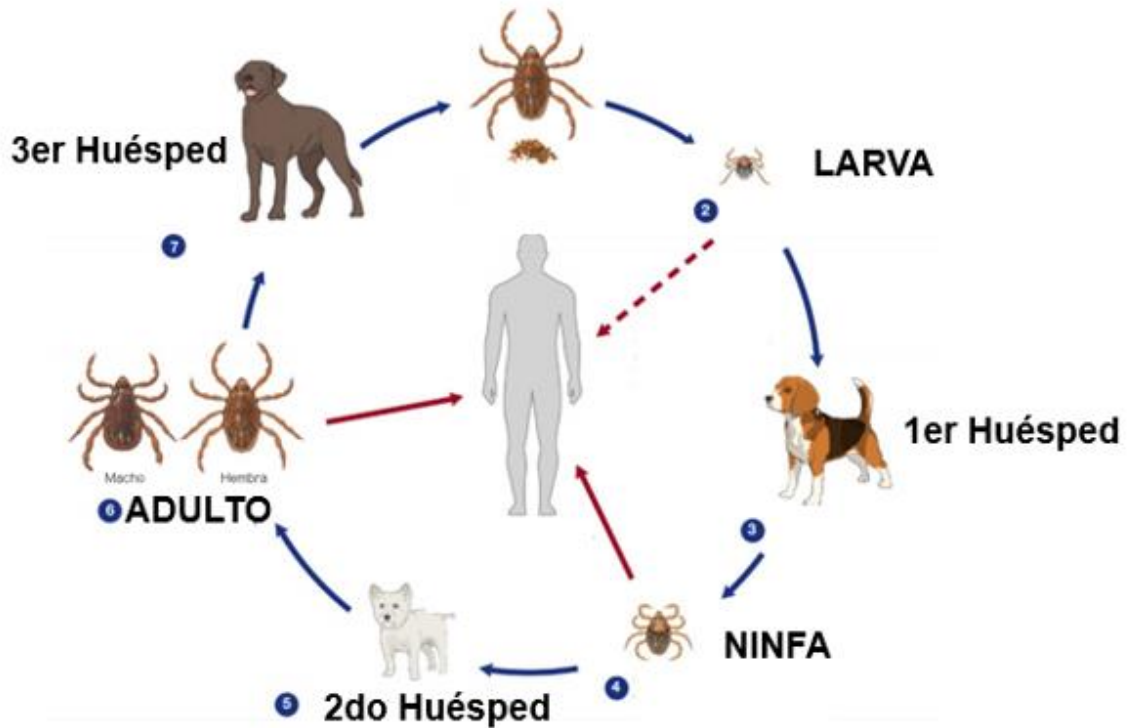


Figura 3. Ciclo de 3 hospedadores. CDC, 2018 (Modificado)

Las garrapatas representan un consorcio abundante de microorganismos distribuidos en distintas locaciones anatómicas los cuales pueden ser transmitidos por medio de la saliva del vector al momento de alimentarse del hospedero (Reuben, 2010).

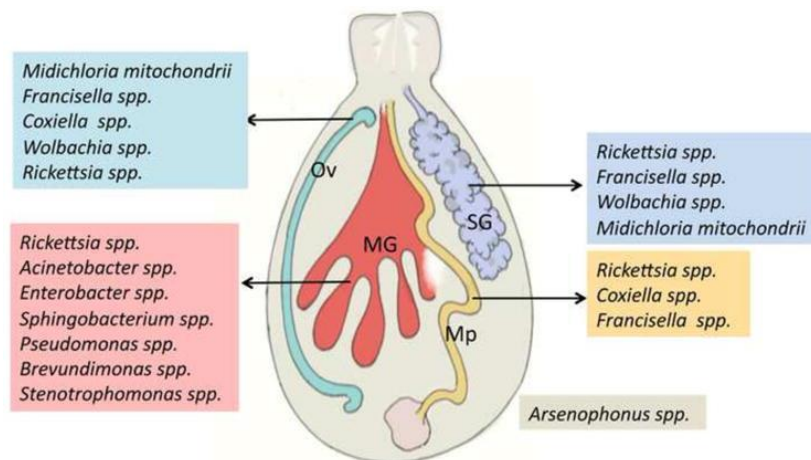


Figura 4. Bacterias presentes en el microbioma de las Garrapatas. Glándulas Salivales (SG), Intestinos (MG), Ovarios (Ov) y túbulos de Malpighi (Mp) (Narasimhan, 2015).

4.2 Distribución geográfica.

Por su continua y rápida diseminación a nivel mundial las enfermedades transmitidas por hemoparásitos son denominadas también enfermedades emergentes. (Silva-Sánchez *et al.*, 2016.). Gran variedad de especies animales salvajes y domesticas son susceptibles a un grupo de enfermedades emergentes, siendo algunas de interés por su potencial zoonótico y con la ayuda de vectores constituyen una amplia red de distribución mundial (Benavides *et a.*, 2012).

Los vectores transmisores de hemoparásitos se encuentran distribuidos en todo el mundo siendo las regiones tropicales y subtropicales las más propicias donde se encuentran las condiciones climáticas que garantizan que cumplan sus estadios biológicos durante todo el año. Los caninos son víctimas ocasionales de las enfermedades hemoparasitarias debido a que estas se relacionan con la distribución y presencia del vector o la garrapata, además que tiene la capacidad de vivir en condiciones climáticas adversas y nuestro medio puede favorecer su desarrollo y crecimiento. (Greig & Armstrong. 2008).

Rodríguez Vivas y colaboradores en 2005 mencionan como los vectores transmisores de hemoparásitos están presentes prácticamente en todo el año. Debido a su alta adaptabilidad al medio ambiente y a los porcentajes de humedad que se presentan anualmente.

4.3 Prevalencia en México

En 2014 Pérez y colaboradores mencionan que en México se tiene reportes de al menos 100 especies de garrapatas lo que corresponde a un 11.2% de la diversidad mundial. En el país las especies más representativas son las compuestas por los géneros *Argarisidae* e *Ixodidae*.

En México se reportan estudios de garrapatas en sector ganadero principalmente, donde su incidencia afecta potencialmente al ganado disminuyendo su potencial productivo y afectando la economía de los ganaderos. Nava. 2010.

En Mexicali, Baja California en el año 2011 se detectó un brote importante de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. En total se han reportado año 2016 un total de 63 casos de Fiebre Manchada y 65 casos de otras rickettsiosis en el territorio mexicano, asociado a enfermedades transmitidas por garrapatas. (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005)

Galaviz Silva y colaboradores en un estudio realizado en el 2013 mencionan como el género *Rhipicephalus* es un trasmisor activo de hemoparásitos en Nuevo León. Así mismo menciona en el mismo año que la presencia de co-infecciones en garrapatas aumenta exponencialmente el riesgo de transmisión de enfermedades a partir de un solo contacto con estos vectores.

Vázquez Espinoza y Beck en 2015 establecen que en el noreste de México para ser exacto en Tamaulipas encontraron una prevalencia del 12.5% de *Ehrlichia canis* en muestras sanguíneas colectadas en perros.

Tamez González en el 2018 realizó un estudio en el área metropolitana de nuevo león donde encontró una prevalencia del 52.7% contrastante totalmente con el 12% encontrado por nosotros, así mismo establece un 4.7% de prevalencia en donde se ve a *Ehrlichia* realizando co-infección con otros patógenos que de igual manera contrasta contra lo encontrado en este trabajo ya que se estableció actualmente un 7%.

Rodríguez Vivas y colaboradores en el 2005 menciona que del otro lado del país se ha establecido una prevalencia del 36% del patógeno *Ehrlichia* haciendo énfasis en que las condiciones climáticas del zona sureste del país puede propiciar este porcentaje de aparición.

Lira Amaya y colaboradores reportan en 2017 uno de los primeros trabajos donde se habla de la prevalencia de Babesia transmitida por garrapatas a perros donde establecen un 6.5% en la zona centro del país donde este porcentaje se encuentra lejos del 38% encontrado en este estudio.

4.4 Hemoparásitos de estudio

4.4.1 *Babesia*

El microorganismo *Babesia* es un protozooario parásito que infecta una gran variedad de animales incluyendo bovinos, perros y humanos. Es un microorganismo cosmopolita por lo cual puede encontrarse en todo el mundo asociado principalmente a la mordedura de garrapatas. La patogénesis está dada por una anemia hemolítica dada la naturaleza intracelular del protozooario. Esta anemia causa una sobreproducción de citocinas dentro del sistema inmune empeorando la respuesta. (Bock & Jackson., 2004)

El primer reporte de este patógeno data alrededor de 1890 por Víctor Babes cuando en Rumania investigaba una enfermedad presente en bovinos y que estaba asociada a la presencia de garrapatas, lo cual la convirtió en la primera enfermedad conocida que se transmitía a animales a través de vectores artrópodos y se describió a esta enfermedad como causa de un protozooario intraeritrocítico que se nombró *Babesia*. (Betancourt JA. 1996)

4.4.1.1 *Taxonomía*

De la familia Babesidae, *Babesia canis* presenta tres subespecies, *B. canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis Rossi* cuyo vector transmisor es la garrapata común del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) (Marenco L., 2013).

Reino Protista

Filo Apicomplexa

Clase Aconoidasida

Orden Piroplasmida

Familia Babesidae

Genero *Babesia*

Tabla 1. Clasificación taxonómica del microorganismo *Babesia*

4.4.1.2 *Morfología*

Su naturaleza de protozooario lo coloca como el hemoparásito más grande dentro de aquellos que son transmitidos por vectores. Sus medidas se encuentran entre 2.4 x 5.0 um, se observa como un organismo de forma piriforme o de lágrima, dentro del eritrocito, comúnmente se observan de a dos parásitos por eritrocito. (Acosta, 2015).

4.4.1.3 *Patogenia.*

La patogenia inicia cuando la garrapata ingiere los merozoitos a partir de un animal infectado, los merozoitos dentro de la garrapata pasan por un proceso denominado esquizogonia dentro de las células epiteliales del intestino de la garrapata, al completar la esquizogonia se denominan macromerozoitos. (Foglia MV *et al.* , 2006)

Este proceso se comienza a repetir también en las glándulas salivales del aparato bucal de la garrapata formando micromerozoitos y estos son la fase infecciosa. Al estar en el aparato bucal, aprovechan el proceso de alimentación de la garrapata entran al hospedador. Una vez que el parasito en su forma de merozoito entra al hospedador, este se vale de sus proteínas de membrana la cual le permiten adherirse a la membrana de los eritrocitos. (Fritz, C. L. 2009)

Una vez unida forman un complejo en forma de anillo lo cual permite la endocitosis permitiéndole entrar al eritrocito en su forma de trofozoíto.

Ya dentro del eritrocito los trofozoítos forman numerosos merozoitos por fisión binaria o merogonia (Stegeman, Birkenheuer, Kruger, y Breitschwerdt, 2003) los cuales salen de la célula por exocitosis y quedan libres en el torrente sanguíneo para comenzar a parasitar nuevas células utilizando el mismo mecanismo.

4.4.1.4 *Signos clínicos*

En un principio los signos más significativos dados a la presencia de Babesia en sangre son la aparición de fiebre, cambio en el comportamiento y los hábitos del animal en los cuales incluye bajo apetito, deshidratación y decaimiento. (Little, S. E. 2010).

La enfermedad la podemos encontrar en varias etapas o fases, la fase aguda se ve caracterizada por un cambio en el estado de ánimo de los animales en los cuales se les encuentra apáticos principalmente, presentan signos de anorexia, ictericia y hemoglobinuria. En animales más jóvenes se puede presentar cuadros más complicados del tipo hiperagudo en los cuales se potencia la presencia de un shock, coma, e incluso muerte por los síntomas de la anorexia. (Codner EC *et al.*,1986)

Durante la etapa crónica de la enfermedad la característica principal es la aparición de una fiebre fluctuante o intermitente, continua la disminución del apetito y el estado de salud en general del animal comienza a empeorar gradualmente. Los síntomas generales presentes en esta etapa son anorexia, apatía, coluria, ictericia, fiebre y palidez. (Cervantes, 2014).

4.4.1.5 *Diagnostico*

Para la detección se pueden utilizar diversas técnicas. El frotis sanguíneo teñido con tinción de Wright o Giemsa representa una técnica sencilla y rápida para observar los parásitos dentro de los eritrocitos, sin embargo, en etapas tempranas de la enfermedad cuando la parasitemia es baja, es posible no encontrar trofozoítos en sangre por lo cual se pudiese realizar un mal diagnóstico arrojando un falso negativo. (Vega MA., 1991)

Sin embargo, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR es considerado el “gold estándar para confirmar el diagnóstico presuntivo, puede ser usado también para monitorizar la progresión de la infección, además de poder detectar infección persistente en pacientes con sintomatología (Ramírez, 2001), (Añez N *et al.*,2007)

4.4.1.6 *Tratamiento*

El tratamiento, tiene como objetivo corregir la anemia y acidosis metabólica severa. Cuando se ha disminuido el hematocrito a un 15 %, se necesita de transfusión sanguínea. Para rehidratar, se hace uso de soluciones de preferencia cristaloides, existen varias drogas en el mercado que combaten en diferente grado las infecciones causadas por Babesia entre las que podemos mencionar: Dipropionato de imidocarb, Berenil, Ganaseg, Lomadine, Phenamidine (García, 2013). Dipropionato de imidocarb, en dosis única de 4-6 mg/kg, ayuda en la desparasitación y tratamiento del canino (Acosta, 2015).

4.4.2 *Ehrlichia*

La Ehrlichiosis es una enfermedad sistémica de carácter agudo la cual se caracteriza con una sintomatología inespecífica y variable. Esto hace que la enfermedad en si pueda confundirse con otras de origen Rickettsial. (Paddock y Childs, 2003; Lantos y Krause, 2002). Los síntomas aparecen alrededor de los 10 días del contacto con el vector de transmisión. (Rikihisa, 1999).

4.4.2.1 *Taxonomía*

Este patógeno es miembro de la familia *Anaplasmataceae*, del orden de las Rickettsias, pertenecientes a la subdivisión α de las proteobacterias. Dentro de esta familia se encuentra el género *Ehrlichia* que incluye *E. chaffeensis* la cual comparte características genéticas y morfológicas con *E. canis*, *E. ewingii*, *E. muris* y *E. ruminatum* en al menos un 97.7%. Todas estas residen en vacuolas citoplasmáticas de la célula hospedera y son agentes zoonóticos transmitidos por vectores (Dumler *et al.*, 2001; Ismail *et al.*, 2010).

El género *Ehrlichia* tiene 6 especies *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, *E. muris*, *E. ruminatum* y *E. mineirensis*, donde algunas de ellas son consideradas potencialmente zoonóticas. (McBride. 2011)

Reino Bacteria

Filo Proteobacteria

Clase Alfa proteobacteria

Orden Rickettsiales

Familia Anaplasmataceae

Genero *Ehrlichia*

Tabla 2. Clasificación taxonómica del microorganismo *Ehrlichia*

4.4.2.2 *Morfología*

Ehrlichia se considera una bacteria pleomórfica, gram negativa, intracelular obligada que carece de pili o capsula. (Anderson *et al.*, 1991). Esta bacteria se describió a partir de su presencia dentro de las vacuolas citoplasmáticas en las células leucocitarias formando agregados dentro de ellas que llevan el nombre de mórulas las cuales asemejan a los cuerpos de inclusión. (Dumler *et al.*, 2001).

4.4.2.3 *Patogenia*

La bacteria al entrar al hospedero se adhiere a la membrana de la célula hospedera y entra por fagocitosis formando una vacuola donde se dividen por fisión binaria durante 48 horas y comienzan a diferenciarse formando una colonia de bacteria llamada mórula que maduran en células denominadas de núcleo denso y son liberadas por lisis celular y comienzan a parasitar células vecinas (Moumene y Meyer, 2016).

4.4.2.4 *Signos Clínicos*

El cuadro clínico es caracterizado por malestares en general entre los que se incluye una fiebre, cefalea, artralgia durante los primeros síntomas. (Lantos y Krause, 2002). Conforme avanza la enfermedad se presentan los síntomas intestinales como nauseas, vomito, diarrea principios de anorexia. (CDC, 2018; Rikihisa, 1999; Oteo y Brouqui, 2005). A nivel cutáneo se puede describir varios tipos de erupciones que se pueden presentar: petequias, máculas, maculopápulas y/o eritema difuso, este síntoma aparece en un 30 a 40% de los pacientes después de aproximadamente 5 días de que inicio la enfermedad, afectando comúnmente extremidades, el tronco y cara

4.4.2.5 *Diagnostico*

Las pruebas de diagnóstico tradicionales (citología, hematología y serología) son útiles e importantes para el diagnóstico, sin embargo, para la EMH y otro tipo de Ehrlichiosis se necesita la detección del agente causal por medio de técnicas moleculares para un diagnóstico conciso (Harrus y Waner, 2011).

La tinción de frotis de sangre periférica, medula ósea o líquido cefalorraquídeo para detectar mórulas pueden ser una prueba rápida pero no confirmatoria de la enfermedad, sobre todo en pacientes con una carga bacteriana baja en sangre y órganos periféricos. Las mórulas son detectadas durante la primera semana de la infección y pueden ser tenidas con diff-quick o Giemsa. (Ismail *et al.*, 2010).

La prueba serológica de anticuerpos IgG e IgM específicos para *E. chaffeensis* utilizando el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es de las más utilizadas para un diagnóstico confirmatorio de EMH por lo que es llamada el “estándar de oro” obteniendo resultados significativos para evaluar la enfermedad entre la 3era y 6ta semana. Aunque la serología es la primera opción a considerar, al igual que la mayoría de las pruebas serológicas se deben considerar que: 1) pueden dar resultados negativos en hasta un 80% en la primera semana de la enfermedad, 2) se pueden producir falsos positivos a causa de anticuerpos de reacción cruzada entre las especies de *Ehrlichia* spp., debido a que estas pruebas no diferencian entre *E. canis*, *E. chaffeensis* u otro tipo de *Ehrlichia* por la estrecha relación filogenética entre estas y, 3) el tratamiento con tetraciclinas en ocasiones reduce o anula la respuesta de anticuerpos contra *Ehrlichia* spp. (Ismail *et al.*, 2010; Little, 2010).

La PCR y sus variantes tienen una alta especificidad (60-85%) y sensibilidad (60-85%) para detectar *E. chaffeensis*, convirtiéndose en la prueba de elección para tener un diagnóstico definitivo.

4.4.2.6 *Tratamiento*

Se ha investigado la susceptibilidad de *Ehrlichia* spp. a varios fármacos incluyendo tetraciclinas (por ejemplo, clortetraciclina, oxitetraciclina, minociclina y doxiciclina), macrólidos (por ejemplo, azitromicina), fluoroquinolonas (por ejemplo, enrofloxacina), cloranfenicol, dipropionato de imicarb y rifampicina (Harrus y Waner, 2004).

La doxiciclina es el antibiótico que se prefiere en humanos (CDC, 2015) y animales (Neer et al., 2002) para tratar la EMH y otro tipo de ehrlichiosis, ya que tienen menos efectos secundarios, una mejor tolerancia del paciente (Ismail et al., 2010) y la respuesta al tratamiento suele ser rápido. La doxiciclina se puede continuar durante 3-5 días después la desaparición de la fiebre o incluso hasta 14 días si hay afectación en sistema nervioso (Ismail et al., 2010; Hongo y Bloch, 2006)

4.5. Métodos de Detección

4.5.1 Serológicos

4.5.1.1 *ELISA*

Se han desarrollado pruebas ELISA para identificar anticuerpos contra *Anaplasma*, *Babesia* y *Rickettsias* en suero bovino y canino. El ELISA es una prueba sensible, específica y brinda la posibilidad de una sencilla interpretación de resultados. Una técnica donde para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad de estos ensayos se han desarrollado técnicas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales y antígenos recombinantes y proteínas específicas del patógeno a identificar. (Cepeda Másmela *et al.*, 2011))

4.5.1.2 IC

La inmunocromatografía es una técnica inmunológica que permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación del oro coloidal del conjugado en zonas específicas del papel de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura. En la actualidad, esta técnica se viene utilizando para el diagnóstico rápido de varias enfermedades, a través de la detección de antígenos en diversos líquidos biológicos. (Ruiz Barahonas, A. G. *et al.*, 2017)

4.5.2 Moleculares

4.5.2.1 PCR punto final

La PCR descrita por Mullis en 1983, supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares. El método posee características especiales de sensibilidad, especificidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad que la hacen útil en identificación y diagnóstico. Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de subgénero, identificación de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual. El éxito de la técnica y la pulcritud de los resultados dependen en gran medida del cuidado que se tenga en evitar contaminación y en el seguimiento de recomendaciones. Y en la utilización de primers específicos que amplifiquen la región del genoma que nos permita identificar al patógeno de interés. (Añez N *et al.*, 2007), (Guevara P. 2004)

4.5.2.2 Multiplex

PCR múltiple permite la realización de una misma reacción, donde diversos pares de *primers* amplificaran fragmentos diferentes de ADN. De esta forma se pueden detectar genes diversos de un mismo organismo o detectar diferentes organismos al mismo tiempo. (Guevara P. 2004)

5 JUSTIFICACION

Debido a que en la actualidad es muy costoso realizar varias pruebas en un mismo paciente con singnología sugerente a enfermedades provocadas por hemoparásitos y que, además, para obtener un diagnóstico confirmatorio no se cuenta con una prueba comercial que determine a varios géneros de hemoparásitos en un solo evento se pretende evaluar un diseño molecular que permita la detección múltiple de los hemoparásitos de interés.

6 HIPOTESIS

Hipótesis de Trabajo

El diseño molecular múltiple amplificará las secuencias específicas de los patógenos sujetos de estudio que estén presentes en las muestras recolectadas.

Hipótesis Alternativa

El diseño molecular múltiple no amplificará las secuencias específicas de los patógenos sujetos de estudio que estén presentes en las muestras recolectadas.

7 OBJETIVO GENERAL

Utilizar un diseño molecular múltiple, para la detección de hemoparásitos a partir de garrapatas colectadas en el área metropolitana de Nuevo León.

8 OBJETIVO ESPECIFICO

1. Realizar un muestreo en distintos Centros de Control Canino ubicados en el área metropolitana del estado de Nuevo León.
2. Estandarizar las condiciones del diseño múltiple para la amplificación de las secuencias blanco de los hemoparásitos de interés.
3. Realizar un análisis de prevalencia sobre la aparición de los hemoparásitos en garrapatas

❖ Muestreo

Para la obtención de las garrapatas se visitaron a los Centros de Control Canino y algunas Clínicas Veterinarias ubicadas en los municipios de la zona metropolitana de Nuevo León:

1. García
2. Escobedo
3. Apodaca
4. Guadalupe
5. San Nicolas de los Garza
6. Monterrey
7. Santa Catarina

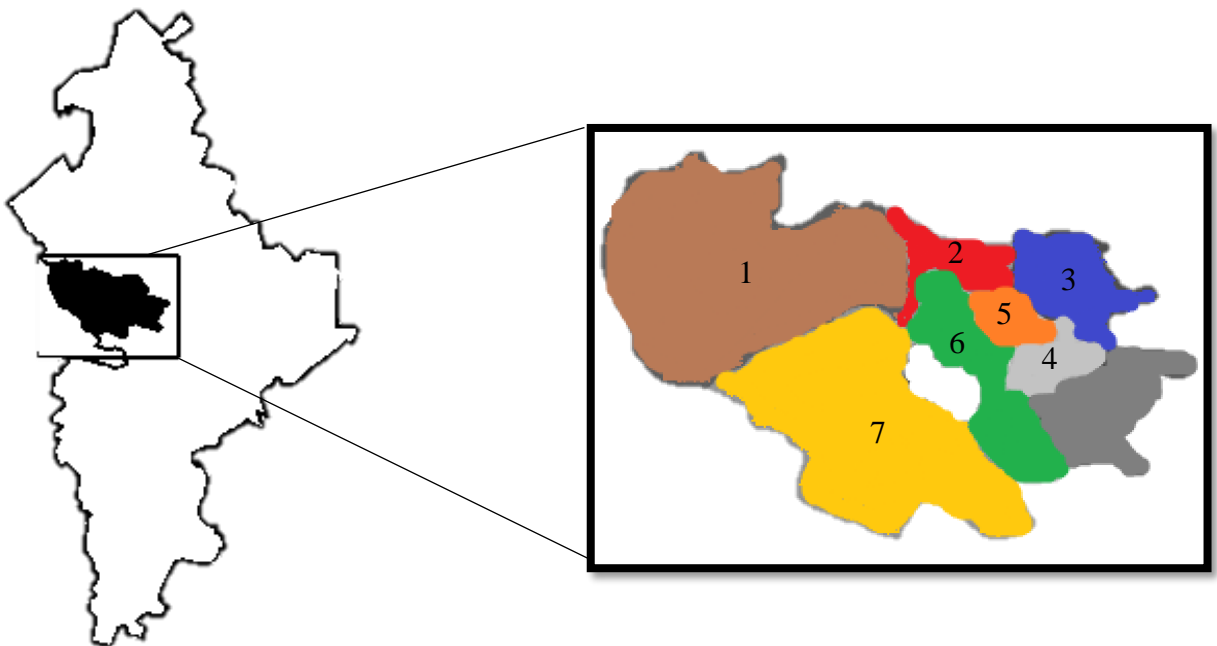


Figura 3. Distribución Geográfica del Estado de Nuevo León y su área Metropolitana.

Se realizó un muestro aleatorio simple de perros infestados con garrapatas en los Centros de Control Canino antes mencionados. Para determinar el número de muestras estadísticamente necesarias se utilizará el programa Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for Veterinary Medicine (Thrusfield et al., 2001, Ortega *et al.*, 2000).

Una vez que se completaron la muestra estadística necesaria la cual correspondió a 400 garrapatas estas fueron almacenadas en alcohol 70% para su posterior identificación y uso.

❖ Identificación de Garrapatas

Las especies recolectadas fueron clasificadas e identificadas de acuerdo a las correspondientes guías de identificación para ectoparásitos y claves dicotómicas pertinentes según las características morfológicas observadas por medio de un estereoscopio.

Las claves dicotómicas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.



Figura 4. Observación e Identificación de Garrapatas.



Figura 5. Garrapatas bajo observación en el estereoscopio para su identificación.

❖ Extracción de DNA Genómico

Una vez que sean identificadas las garrapatas, se realizara el protocolo de Extracción de DNA mediante el método de Fenol-Cloroformo mencionado por Ferrer *et al.* 2001. Para la extracción de DNA se requirió previamente macerar las muestras de garrapatas por lo que se utilizó el equipo de macerado FastPrep®-24 (MP Biomedicals) modificado. En un tubo de lisis de 2 ml con vidrio molido de diferente tamaño, se colocó un espécimen, en el caso de garrapatas hembra adultas y 3 especímenes en caso de machos o ninfas. Y se agregaron 500 µl de Buffer de Lisis y se realizaron al menos 6 ciclos de 1 minuto de agitación y 5 minutos de descanso en el FastPrep®-24 (MP Biomedicals).

Para la extracción de DNA genómico a partir del macerado de garrapata, se realizó mediante el método de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1).

El material que resultante de la maceración fue centrifugado a 13,000 rpm por 2 minutos. Se tomo la mayor cantidad del sobrenadante y se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se incubo en un baño María a 65°C por período de 1 hora, dando agitación cada 15 minutos para homogenizar el contenido. Posteriormente se añadieron 500 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1) y se centrifugo a 14,000 rpm por 15 minutos. Un volumen total de 350 µl del sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 65 µl de Acetato de Sodio (NaOAc) y 75 µl de Cloruro de Sodio (NaCl), la muestra se homogenizo de manera manual por inversión y se congelo durante 30 minutos. Posterior a este tiempo, se centrifugo a 12,000 rpm por 10 minutos, se tomaron 500 µl de sobrenadante y se colocaron en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se le añadió 270 µl de Isopropanol y se congelo a -20°C por toda la noche. Al día siguiente se realizó una centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y se realizó un lavado con etanol al 70%, el cual se centrifugo a 10,000 rpm por 5 minutos. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en la incubadora a 37°C. Posteriormente el pellet obtenido fue reconstituido con 20 µl de buffer TE y se almaceno a -20°C hasta su posterior uso.

❖ Cuantificación de DNA Genómico

Una vez realizada la extracción de DNA y para comprobar que las muestras tuvieras DNA se realizó una cuantificación.

El DNA puede ser cuantificado debido a su capacidad de absorber luz UV en el espectro 240/260 nanometros. La cuantificación fue realizada con el equipo NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific proporcionado por los Laboratorios Hèlica Diagnostics & Research S.A. de C.V.



Figura 6. Proceso General para la obtención de DNA Genómico a partir de muestras de Garrapatas.

❖ Búsqueda de controles positivos

Para la búsqueda de controles positivos previamente se buscó un juego de primers que amplificaran individualmente para los patógenos de interés. Los primers fueron los siguientes.

- *Ehrlichia* spp.

Primer		Secuencia	Fragmento	Referencia
<i>ECB</i>	Forward	CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC		
<i>ECC</i>	Reverse	AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG CC	500 pb	

Tabla 3. Juego de primers utilizados para la amplificación del hemoparásito *Ehrlichia*

- *Babesia* spp

Primer		Secuencia	Fragmento	Referencia
<i>BB1</i>	Forward	GGT AAC GGG GAA TTA GGG TTC GAT		
<i>BB2</i>	Reverse	CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC CG	230 pb	

Tabla 4. Juego de primers utilizados para la amplificación del hemoparásito *Babesia*

Debido a que patógenos como *Ehrlichia* y *Babesia* no se consiguen de manera comercial debido a su potencial patogénico y zoonótico, con los primers anteriores se realizó un tamizaje de muestras de manera individual para la obtención de secuencias que amplificaran y utilizarlas como controles positivos.

Los primers para *Ehrlichia* “Tabla. 3” según reportes realizados en el GenBank por Dawson *et al.*, 2004 se indica que amplifican un fragmento de 500 pb dentro de la región del ADNr 16S del género *Ehrlichia*.

Los primers para *Babesia* “Tabla. 4” fueron realizados dentro del departamento de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL y el fragmento corresponde a una amplificación de 220 pb dentro de la región pequeña del RNA ribosomal del género *Babesia*

❖ Secuenciación de controles

Los controles positivos previamente obtenidos con los primers de la Tabla 1 y Tabla 2 fueron sometidos a un protocolo de secuenciación para determinar mediante la herramienta BLAST del NCBI que las secuencias amplificadas fueran correspondientes a las secuencias de los patógenos de interés.

Lo primero que se realizó fue purificar los productos de PCR obtenidos con ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent de Applied Biosystems™. Se mezclaron 2 µl de ExoSAP-IT por cada 5 µl del producto de PCR a utilizar, para llegar a un volumen final de 7 µl totales. Posteriormente se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos para activar las enzimas y degradar los productos residuales no deseados. Una vez pasado este tiempo se puso a incubar a 80°C por 1 minuto para inactivar los componentes de ExoSAP-IT y una vez pasado esto el producto se encontraba listo para amplificarse y comenzar la reacción de secuenciación.

Para realizar la reacción de secuenciación se utilizó el kit BigDye X Terminator™. Se prepararon las reacciones conforme a la tabla tal para las secuencias a amplificar y se utilizó un control positivo el cual era correspondiente a un vector pGEM

Componente	Cantidad por reacción	Control pGEM
Big Dye Reaction Mix	8 µl	8 µl
Primer	1 µl a 3.2 pmol	4 µl
Templado DNA	7 µl con 10 ng	2 µl
Buffer	4 µl	2 µl
Agua	0 µl	4 µl
Volumen Total	20 µl	20 µl

Tabla 5. Condiciones para la amplificación de muestras a secuenciar.

Una vez preparadas las reacciones se sellaron bien los tubos y se centrifugaron por 1 min a 1000 RPM para asegurar la homogeneidad de todos los componentes de la reacción. Los tubos se metieron a PCR bajo el protocolo siguiente.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	96 °C	1 min
Desnaturalización	96 °C	10 sec
Alineación	50 °C	5 sec
Extensión	60 °C	4 min
Hold	4 °C	

Tabla 6. Protocolo de PCR para amplificación de productos para secuenciar.

Una vez que salieron del termociclador los productos fueron purificados para eliminar el componente BigDye, por lo cual a cada tubo de reacción se le agrego 45 µl de Solución SAM y 10 µl de solución BigDyeXterminator (BDX) y se mezclaron vigorosamente por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 1000G por dos minutos. Una vez realizado esto la muestra estaba lista para ser corrida en el aparato Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer System with SmartStart.



Figura 7. Equipo secuenciador SeqStudio™ by Applied Biosystems™

❖ Estandarización de la PCR Multiplex

Una vez que se obtuvieron los controles positivos y fueron verificados mediante secuenciación se procedió a estandarizar las condiciones para la amplificación múltiple por PCR. Para estandarizar las condiciones se buscaron alternativas para realizar la mezcla de reactivos de PCR la cual está compuesta por la Master Mix que es el reactivo que contiene la enzima Taq Polimerasa, contiene los oligonucleótidos, Buffer como solución tamponante y Magnesio como cofactor de la reacción. Así mismo se agregan los primers ya mencionados (Primers ECB, ECC y BB1, BB2) y DNA genómico extraído de las muestras colectadas.

Posteriormente se realizó un gradiente de temperaturas para determinar la temperatura óptima de alineamiento para la amplificación múltiple con los primers seleccionados. En base a la T_m de los primers se realizó un ensayo con temperaturas que iba desde los 55°C a los 68°C.

El obtener la temperatura óptima es una guía que nos permitirá realizar la técnica de PCR de manera múltiple. Una vez que se obtenga se realizaron análisis de sensibilidad, en los cuales se utilizaron cantidades conocidas de DNA hasta determinar cuál era el mínimo detectable por la prueba de PCR. Así mismo se realizó una prueba de repetibilidad con las muestras de DNA genómico obtenido, al realizar el experimento múltiples veces se puede determinar que este es funcional como una prueba diagnóstica.

Para esto se corrieron las 400 muestras de DNA obtenidas del muestro de Garrapatas y así determinar una frecuencia de aparición de los patógenos *Babesia* y *Ehrlichia* en la zona metropolitana de Nuevo León.

❖ Diseño Experimental

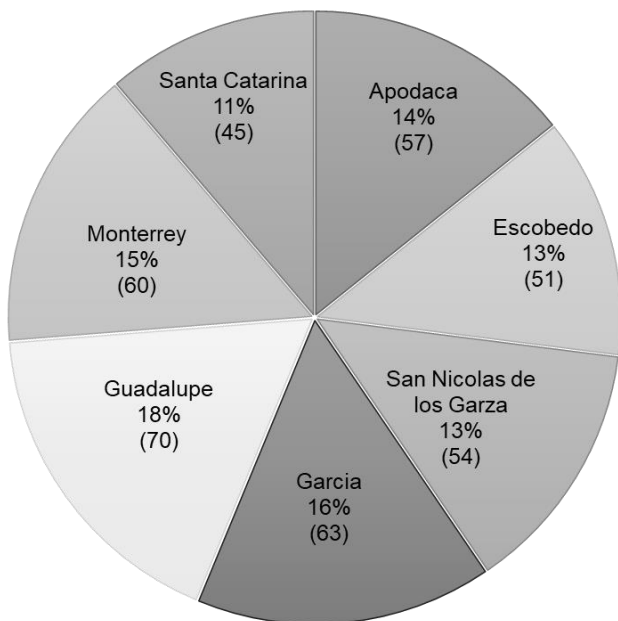
Se utilizó un diseño de Chi Cuadrada con tablas de contingencia para determinar la dependencia de la prevalencia por municipio. Al utilizar este diseño podemos observar si la infección de cada patógeno depende de cada municipio o se trata de otro tipo de influencia la que determine la presencia o ausencia del patógeno en la determinada área de estudio.

10 RESULTADOS

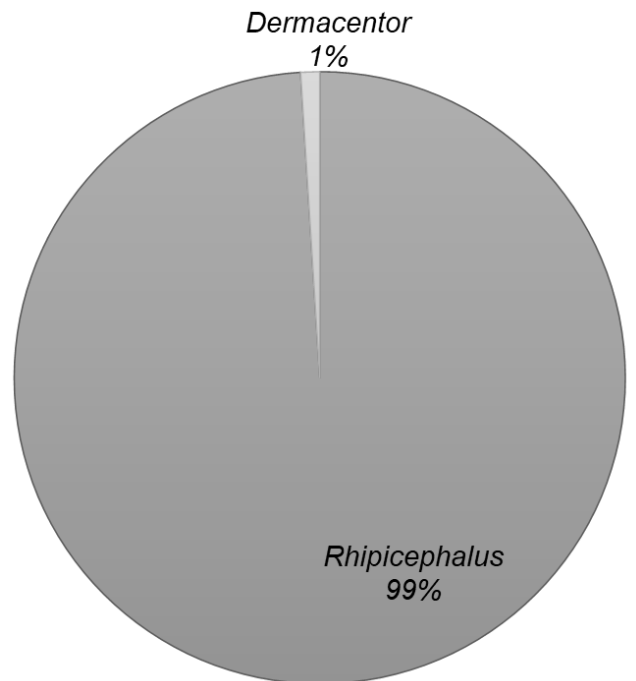
✓ Muestreo e identificación.

Las muestras fueron obtenidas dentro de los municipios de la zona metropolitana de Nuevo León. El municipio de Guadalupe fue donde más muestras se obtuvieron con 70 muestras y corresponde al 18% del muestreo, seguido García con 63 muestras, Monterrey con 60 muestras, Apodaca con 57, San Nicolas de los Garza con 54, Escobedo con 51 y el municipio donde menos se muestrearon fue en el municipio de Santa Catarina con 45 muestras y corresponde al 11% del muestreo. Los muestreos se dieron de manera asimétrica dado a la disponibilidad del centro de control canino el día del muestreo.

Y al analizar los muestreos se encontró casi en su totalidad con un 99% de aparición las garrapatas colectadas correspondían al género *Rhipicephalus* y el restante al género *Dermacentor*.



Grafica 1. Distribución de las muestras en los municipios del área metropolitana de Nuevo León, N total de 400.



Grafica 2. Distribución de los géneros obtenidos en el muestreo.

✓ Extracción y Cuantificación de DNA.

Una vez con las muestras recolectadas se procedió a su procesamiento el cual consistió en la maceración de cada muestra individual y una vez macerada la muestra se realizó el protocolo de extracción de DNA descrito por Ferrer *et al.* 2001 (Figura 6).

El método de Fenol-Cloroformo es un método de extracción bastante útil y económico, ya que se basa en una extracción orgánica en el cual con enzimática y sales se separa la parte inorgánica de la célula para separar los componentes orgánicos de las células y posteriormente precipitar el material genético con ayuda de alcoholes.

El DNA tiene la capacidad de absorber luz a una longitud de onda de 240-260 nanómetros por lo que puede ser cuantificado en estas condiciones. Para realizar esto se utilizó el equipo NanoDrop el cual nos permitió observar la presencia de DNA en calidad y cantidad aceptable en nuestras 400 muestras.

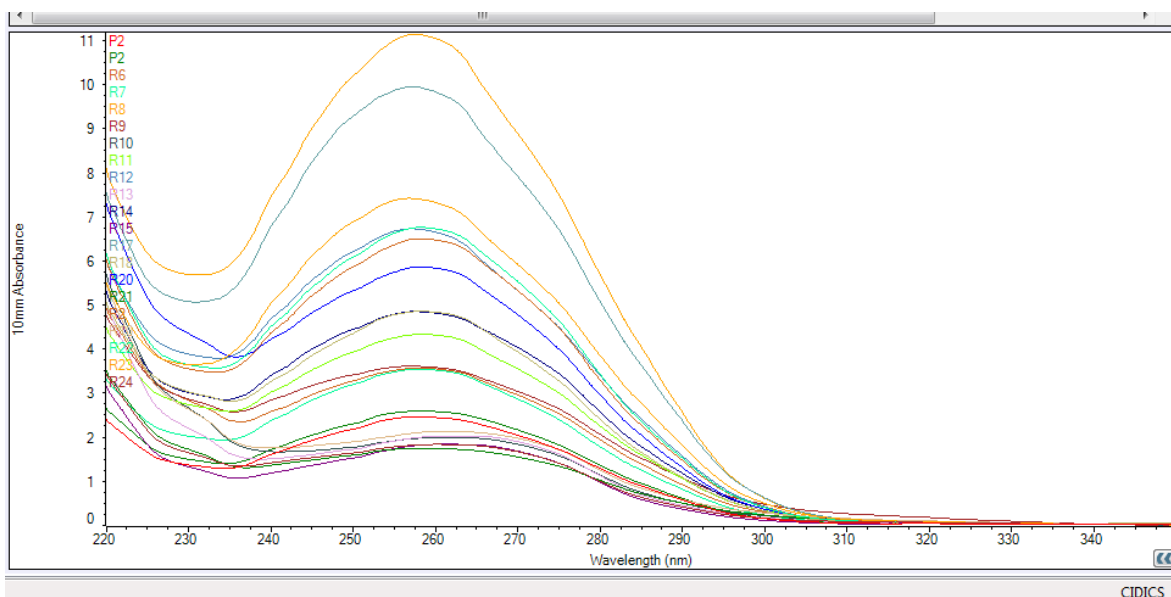


Figura 8. Cuantificación de DNA por el equipo NanoDrop. Se observa el pico de absorbancia a una longitud de onda de (240-260 nm)

✓ Controles individuales y Secuenciación.

Con los primers mencionados en las tablas tal y tal se realizó un tamizaje de muestras para la obtención de controles positivos. Es decir, se tomaron muestras aleatorias de nuestro muestro y se probaron con los primers para determinar si estas muestras eran positivas para los patógenos *Babesia* y *Ehrlichia* para obtener controles de manera individual. Los productos de PCR se corrieron en un gel de Agarosa a 1.5% por 90 min a 120 volts.

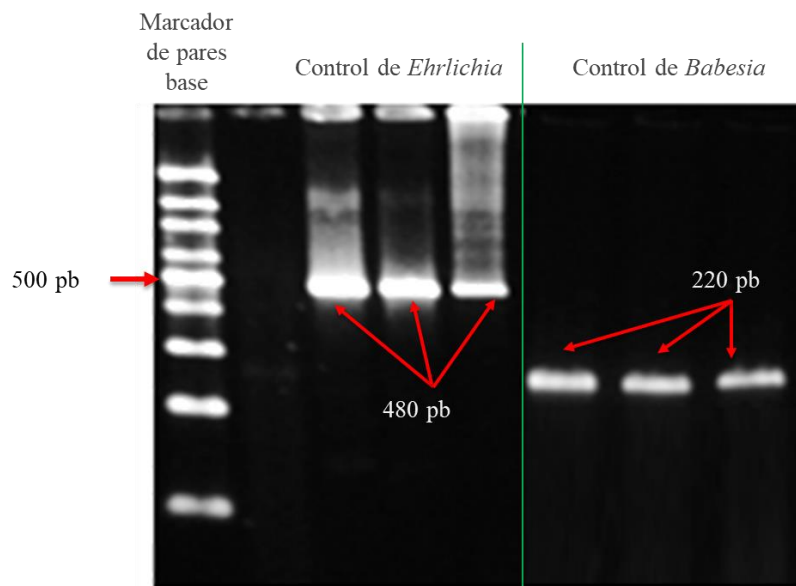


Figura 9. Controles positivos individuales para *Ehrlichia* (480pb) y *Babesia* (220 pb)

Para verificar que las amplificaciones obtenidas correspondieran al gen determinado por los primers y así poder considerar a las muestras como positivas para los patógenos en cuestión se procedió a secuenciar algunos controles para poder comparar las secuencias con las ya reportadas en el GenBank y poder corroborar que nuestros controles fueran fiables.

Para realizar la secuenciación se realizó el procedimiento de la tabla tal en la cual previamente se purificó el producto de PCR para poder ser secuenciado en el equipo tal

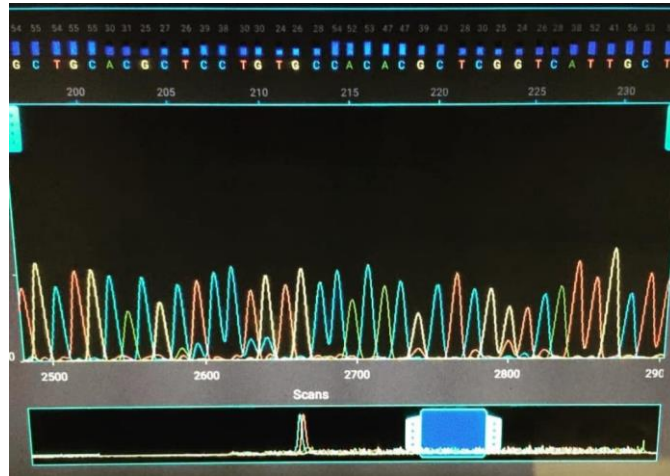


Figura 10. Secuenciación para determinar los controles positivos

Al secuenciar las muestras y analizar las secuencias en la herramienta Nucleotide BLAST nos permitió determinar que nuestros controles tanto para *Ehrlichia* como para *Babesia* tenían un 100% de identidad con secuencias ya reportadas. Lo cual nos demostró que los primers amplificaban para los patógenos esperados.

[Ehrlichia canis isolate 25-74TX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence](#)

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Ehrlichia canis	46.1	92.2	100%	0.015	100.00%	434	MH620197.1

Figura 11. Análisis BLAST para las secuencias de los controles de *Ehrlichia*.

[Babesia sp. TS2018-27 gene for 18S rRNA, partial sequence](#)

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Babesia sp.	48.1	48.1	100%	0.005	100.00%	1246	LC593273.1

Figura 12. Análisis BLAST para las secuencias de los controles de *Babesia*.

- ✓ Estandarización de la PCR.

La mezcla de reactivos para la reacción se trabajó conforme a las especificaciones del fabricante del MasterMix, sin embargo, se comenzó a realizar pruebas para disminuir el volumen de reacción con la finalidad de optimizar al máximo el uso de reactivos. La mezcla se estableció finalmente con un volumen final de 10 μ l.

Componente	Cantidad
Taq Polimerasa	5 μ l
Primers Ehrlichia	1 μ l
Primers Babesia	1 μ l
DNA Genómico	3 μ l
Total de Rx	10 μ l

Tabla 7. Componentes constitutivos de la PCR múltiple.

Para determinar las condiciones óptimas en que la PCR podría amplificar de manera múltiple a ambos patógenos en una sola reacción se realizaron diversos ensayos. Primero se determinó la temperatura optima de alineamiento, para determinar esto se tomaron varias temperaturas con las TM de ambos primers hasta determinar cuál era la temperatura óptima. Para esto se realizó un gradiente de temperaturas en un rango desde los 55°C hasta los 68°C.

Los resultados determinaron que la temperatura donde se presentaban amplificaciones visibles y optimas fue a una temperatura de 60°C por lo que se determinó a esta como la temperatura optima de alineamiento.

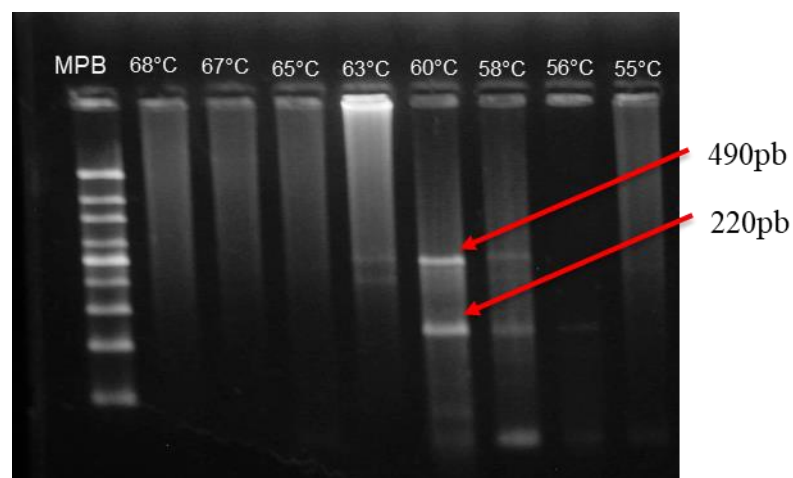


Figura 13. Gradiente de temperaturas para determinar la Tm optima de la reacción

Ya con la T_m óptima se programó un protocolo de PCR para la amplificación múltiple de *Babesia/Ehrlichia*.

Proceso	Tiempo	Temperatura (°C)	
Desnaturalización	5 min	94°C	
<i>Desnaturalización</i>	<i>1 min</i>	<i>94°C</i>	
<i>Alineamiento</i>	<i>1 min</i>	<i>60°C</i>	40X
<i>Elongación</i>	<i>1 min</i>	<i>72° C</i>	
Elongación	5 min	72°C	

Tabla 8. Protocolo para PCR múltiple.

Una vez que se estandarizaron las condiciones para que la PCR múltiple amplificara, se buscó determinar la sensibilidad de la prueba. Por lo que se tomó una muestra positiva con una concentración conocida y se realizaron diluciones para tener muestras con DNA con una concentración determinada para poder determinar cuál era el mínimo detectable por la reacción. Los resultados determinaron que el mínimo detectable para la reacción correspondió a una concentración de 40 ng/μl.

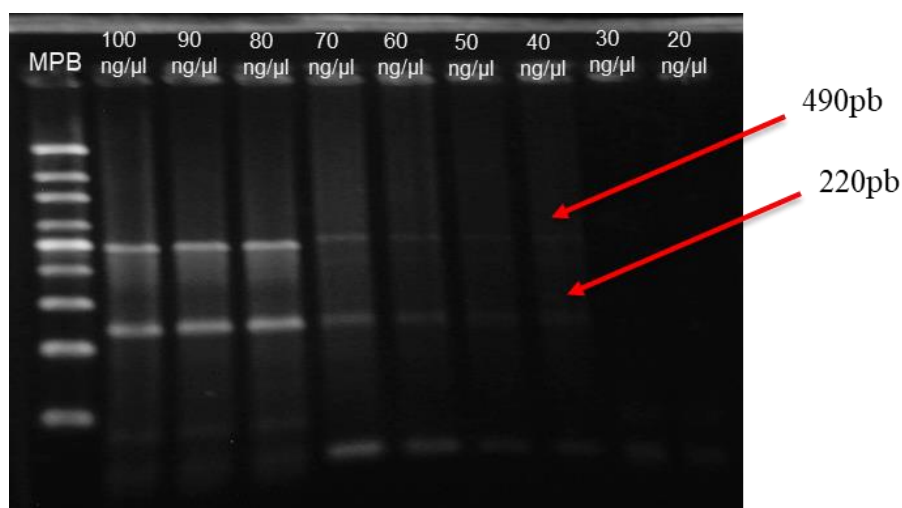
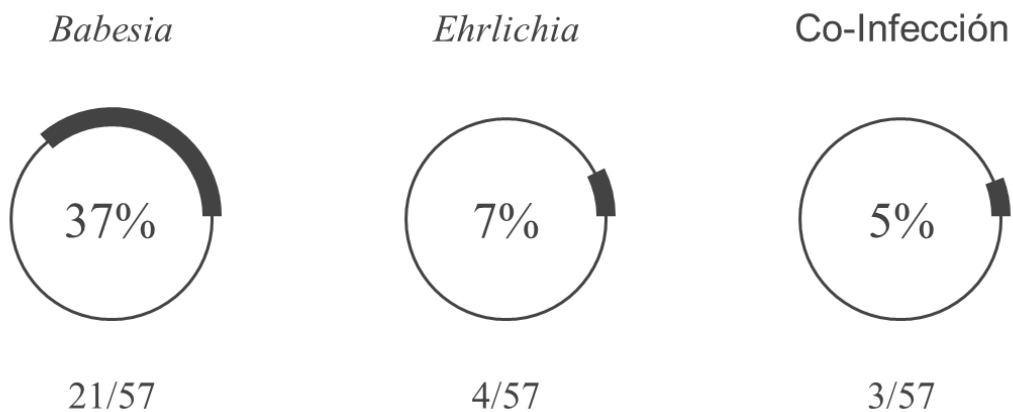


Figura 14. Determinación de la sensibilidad de la prueba de PCR multiplex.

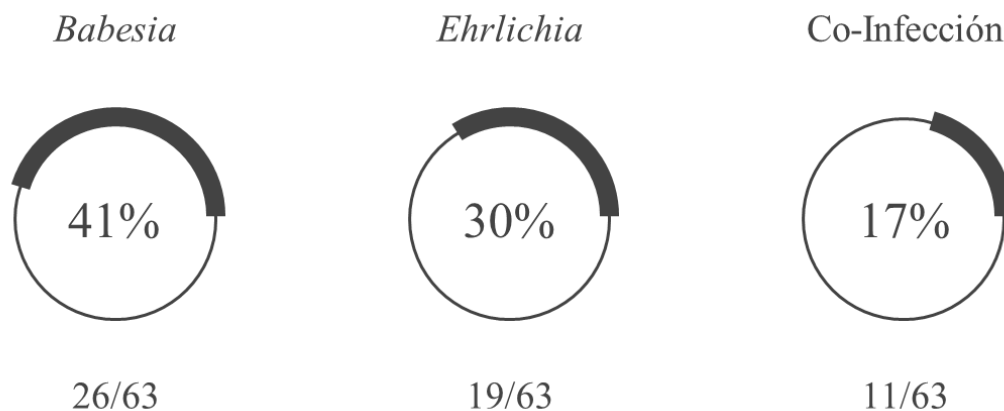
✓ Frecuencia de aparición de patógenos.

Con la prueba estandarizada se comenzaron a correr las muestras de manera individual para determinar un porcentaje de frecuencia de aparición de los patógenos *Babesia* y *Ehrlichia* a partir de garrapatas dentro de los municipios muestreados pertenecientes a la zona metropolitana del estado de Nuevo León.

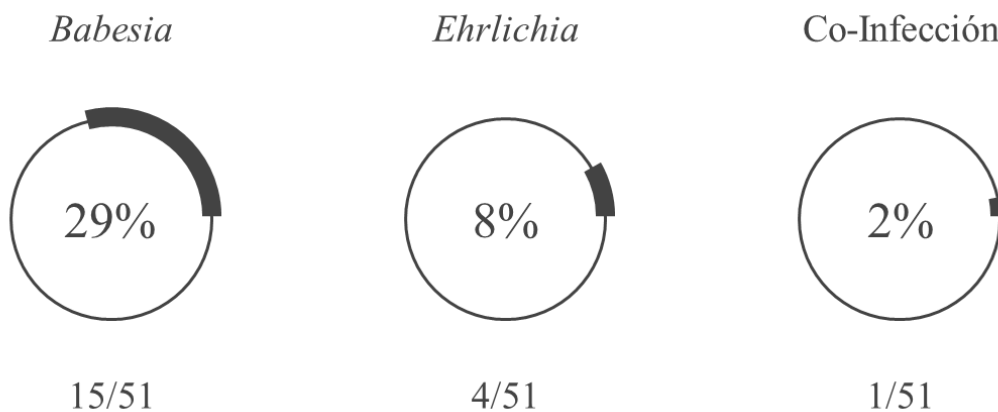
Para el municipio de **Apodaca** se recolectaron 57 muestras de las cuales 21 fueron positivas para *Babesia* lo cual corresponde al 37%. Para *Ehrlichia* tenemos 4 positivas lo cual corresponde al 7%. Y se encontraron 3 muestras positivas a ambos patógenos lo que corresponde al 5%.



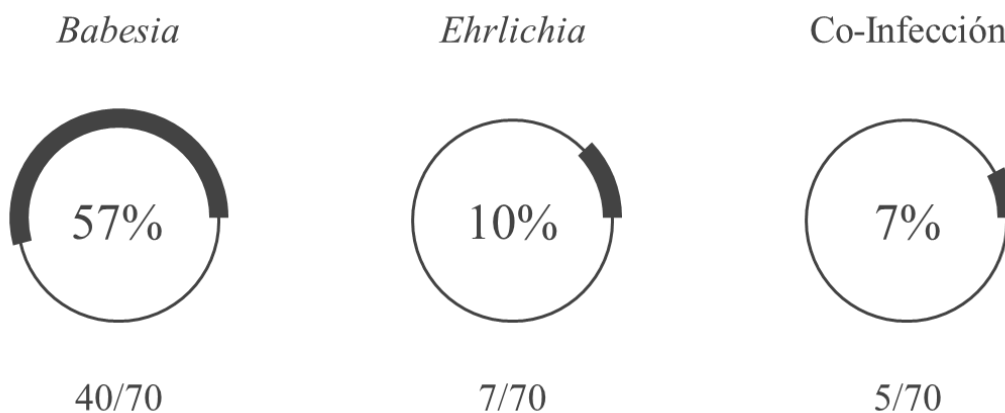
Para el municipio de **García** fueron 63 muestras y se encontró que el 41% fue positivo a *Babesia*, el 30% positivo para *Ehrlichia* y 17% presento una co-infección para ambos patógenos.



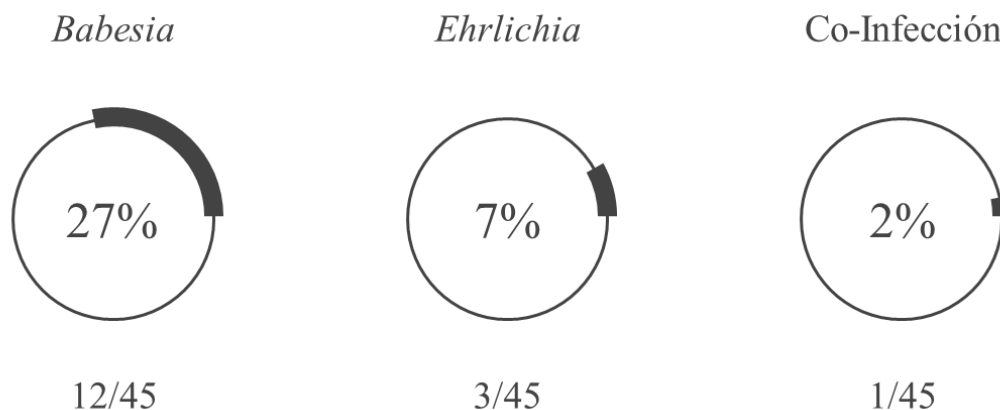
Para el municipio de **Escobedo** fueron 51 muestras y se encontró que el 29% fue positivo a *Babesia*, el 8% positivo para *Ehrlichia* y 2% presento una co-infección para ambos patógenos.



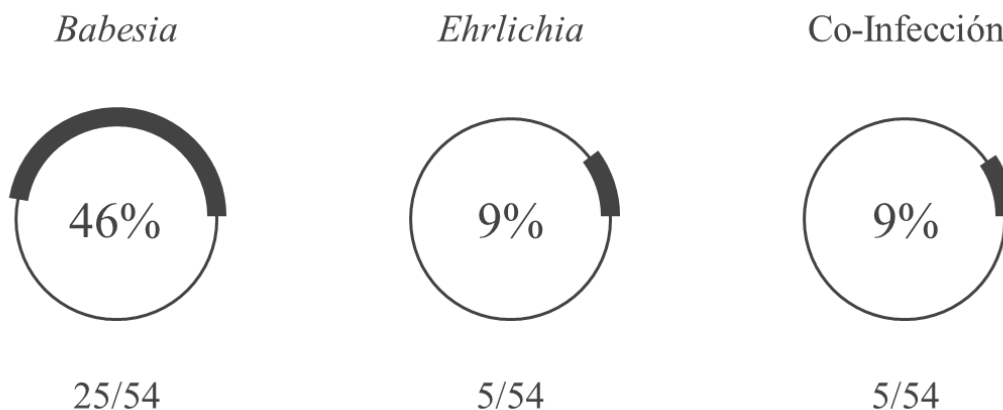
Para el municipio de **Guadalupe** fueron 70 muestras y se encontró que el 57% fue positivo a *Babesia*, el 10% positivo para *Ehrlichia* y 7% presento una co-infección para ambos patógenos.



Para el municipio de **Santa Catarina** fueron 45 muestras y se encontró que el 27% fue positivo a *Babesia*, el 7% positivo para *Ehrlichia* y 2% presento una co-infección para ambos patógenos.



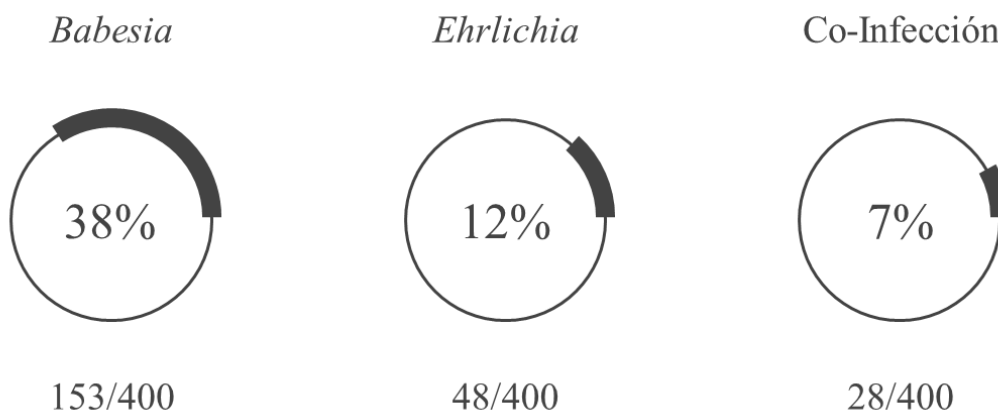
Para el municipio de **San Nicolas de los Garza** fueron 54 muestras y se encontró que el 46% fue positivo a *Babesia*, el 9% positivo para *Ehrlichia* y 9% presento una co-infección para ambos patógenos.

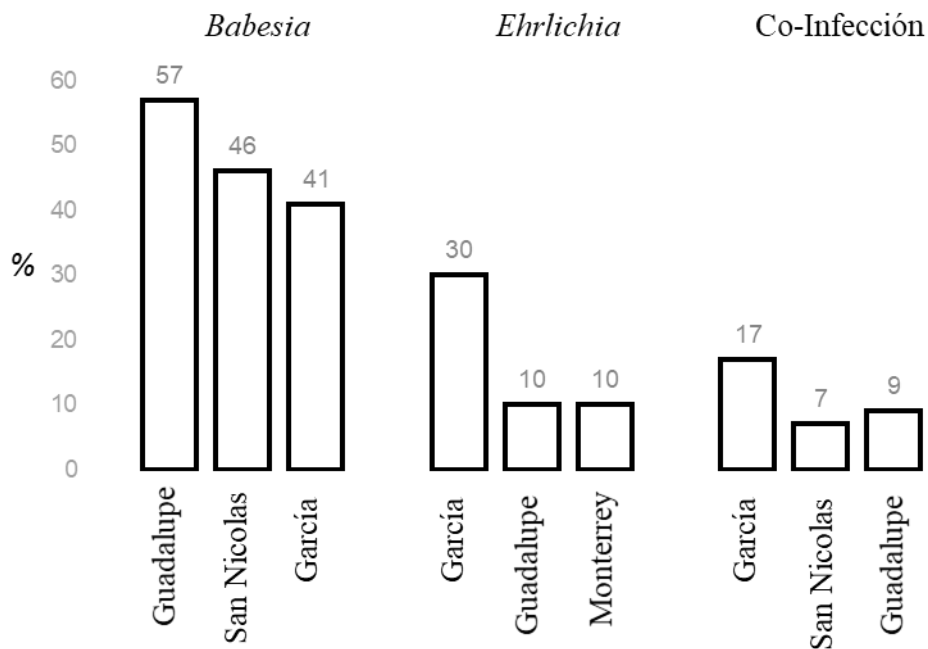


Para el municipio de **Monterrey** fueron 60 muestras y se encontró que el 23% fue positivo a *Babesia*, el 10% positivo para *Ehrlichia* y 3% presento una co-infección para ambos patógenos.



En su conjunto para el **área Metropolitana** fueron 400 muestras sometidas a estudio y se encontró una prevalencia del 38% a *Babesia*, el 12% positivo para *Ehrlichia* y 7% presento una co-infección para ambos patógenos.





Grafica 3. Porcentaje de mayor frecuencia de aparición de los patógenos en los municipios.

El compendio de resultados arrojo que para el patógeno *Babesia* el municipio de Guadalupe es el que mayor frecuencia de aparición con un 57% de sus muestras, para el patógeno *Ehrlichia* el municipio de García es el que mayor frecuencia de aparición presenta con un 30% de sus muestras y para el caso de co-infeccion de igual manera el municipio de García presento la mayor frecuencia de aparición de ambos patógenos.

✓ Diseño estadístico.

Se utilizó un diseño de Chi Cuadrada con tablas de contingencia para determinar la dependencia de la prevalencia por municipio. Al comparar las variables de prevalencia en cada municipio para los 3 casos siendo

caso 1 prevalencia de Babesia

caso 2 siendo prevalencia de Ehrlichia

caso 3 prevalencia de Co-infección

Patógeno	Chi-Cuadrada Tablas	Chi-Cuadrada Calculada	Decisión
<i>Babesia</i>	12.5916	22.2451	Ho se rechaza
<i>Ehrlichia</i>	12.5916	23.9351	Ho se rechaza
Co-Infección	12.5916	16.085	Ho se rechaza

Tabla 9. Resultados prueba estadística de chi-cuadrada con tablas de contingencia.

Para los 3 casos la chi cuadrada calculada es mayor que la chi cuadrada de tablas por lo cual se rechaza la Ho y nos dice que hay una diferencia significativa entre los municipios con un alfa de 0.05.

En palabras más claras indica que en algunos municipios hay más prevalencia de los patógenos que en otros, ya que no se distribuye uniformemente por distintos factores predisponentes.

A manera de discusión tenemos que Bolívar y colaboradores en el 2013 mencionan sobre la importancia de las técnicas moleculares múltiples como herramientas de detección en un solo ensayo ahorrando tiempo y reactivos. Rodríguez Vivas y colaboradores en 2005 mencionan como los vectores transmisores de hemoparásitos están presentes prácticamente en todo el año. Galaviz Silva y colaboradores en un estudio realizado en el 2013 mencionan como el género *Rhipicephalus* es un trasmisor activo de hemoparásitos en nuevo león y esto hace concordancia con las prevalencias encontradas en este trabajo ya que el muestreo casi en su totalidad correspondió al género mencionado por el autor. Así mismo menciona en el mismo año que la presencia de co-infecciones en garrapatas aumenta exponencialmente el riesgo de transmisión de enfermedades a partir de un solo contacto con estos vectores.

Por otro lado, Vázquez Espinoza y Beck en 2015 establecen que en el noreste de México para ser exacto en Tamaulipas encontraron una prevalencia del 12.5% de *Ehrlichia canis*, esto es concordante con lo encontrado en este estudio donde encontramos un 12%. Por otro lado, Tamez González en el 2018 realizó un estudio en el área metropolitana de nuevo león donde encontró una prevalencia del 52.7% contrastante totalmente con el 12% encontrado por nosotros, así mismo establece un 4.7% de prevalencia en donde se ve a *Ehrlichia* realizando co-infección con otros patógenos de igual manera contrasta contra lo encontrado en este trabajo ya que se estableció actualmente un 7%. Rodríguez Vivas y colaboradores en el 2005 menciona que del otro lado del país se ha establecido una prevalencia del 36% del patógeno *Ehrlichia* haciendo énfasis en que las condiciones climáticas de la zona sureste del país pueden propiciar este porcentaje de aparición. Por último, Lira Amaya y colaboradores reportan en 2017 uno de los primeros trabajos donde se habla de la prevalencia de *Babesia* transmitida por garrapatas a perros donde establecen un 6.5% en la zona centro del país, este porcentaje se encuentra lejos del 38% encontrado en este estudio.

Según Ramírez, M. A. (2001) existen diversos factores por los cuales pueden presentarse las apariciones de patógenos asociados a vectores dentro de una población, si bien en este estudio se presentó que la distribución era asimétrica es decir pese a que se presentaba en todos los municipios, no fue uniforme la manera de presentarse entre ellos, lo cual llevo a que existiera mayor porcentaje de aparición en unos que en otros. Esto va fuertemente ligado a diversos factores predisponentes que actúan de manera intrínseca dentro del proceso de reproducción del vector. Factores como el tipo de suelo mayormente presente en donde se encontraban los animales, el tipo de alimentación que llevaban, la tasa de tiempo que llevaban en situación de calle en contacto con plantas y otros animales, el tipo de cuidado que llevaban etc.

Edward Huerto-Medina menciona en 2015 que si bien estos factores predisponentes suelen ser mas notorios y evidentes dentro de poblaciones que se encuentran significativamente separadas geográficamente ya que en una población autóctona o de nicho suelen llevarse las mismas actividades por lo cual no habría diferencia significativa con la población. Sin embargo, lo encontrado en este estudio difiere ya que en una población metropolitana con municipios circundantes se encontró una disparidad estadística la cual nos dice que aquellos factores más allá del clima y la alimentación son los que realmente impactan sobre la diseminación y propagación de vectores transmisores de patógenos.

12 CONCLUSION

- Se consiguió estandarizar las condiciones para la amplificación múltiple de los patógenos *Babesia* y *Ehrlichia* a partir de DNA Genómico extraído de muestras de Garrapatas colectadas en la zona Metropolitana de Nuevo León.
- Estadísticamente se demostró que las infecciones por hemoparásitos eran independientes de cada municipio.
- El municipio de Guadalupe fue el que presento el mayor porcentaje de prevalencia del parásito *Babesia* con un 57% del total de muestras.
- El municipio de García fue el presento mayor porcentaje de prevalencia del patógeno *Ehrlichia* con un 30% del total de muestras.
- El municipio de García fue el presento mayor porcentaje de Co-Infecciones con un 17% del total de muestras.

13 PERSPECTIVAS

Con los resultados conseguidos en este trabajo suponen una base para seguir investigando y desarrollando la técnica para lograr aumentar el número de patógenos a detectar de manera simultánea en un mismo ensayo. Esto permitiría lograr disminuir el costo operativo de la prueba y el costo beneficio sería más atractivo como un nuevo modelo de detección de patógenos transmitidos por garrapata.

1. Acosta Aguilar, L. (1985). Determinación de *Babesia canis* en frotis sanguíneos y su correlación con el estado físico-clínico del perro en el Puerto de Veracruz. Tesis presentada a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana.
2. Anderson, B. E., Dawson, J. E., Jones, D. C., & Wilson, K. H. (1991). *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 29(12), 2838-2842.
3. Benavides Ortíz, E., Polanco Palencia, N., Vizcaíno Gerdts, O., & Betancur Hurtado, Ó. (2012). Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Revista Ciencia Animal*, 1(5), 31-49.
4. Betancourt, J. A. (1996). Epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades parasitarias en bovinos. Compendio No. 2–Medellín, noviembre de 1996. Colombia. *CORPOICA*.
5. Beugnet, F., & Marie, J. L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary parasitology*, 163(4), 298-305.
6. Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247.
7. Bolívar, A. M. (2013). Metodología diagnóstica para hemoparásitos dentro de la ganadería bovina con énfasis en la reacción en cadena de la polimerasa y su variante múltiple. *Revista de Salud Animal*, 35(1), 1-9. (añez)
8. Brites-Neto, J., Duarte, K. M. R., & Martins, T. F. (2015). Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Veterinary world*, 8(3), 301.
9. CDC. (2018). Tickborne diseases of the united states: a reference manual for healthcare providers. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/ticks/tickbornediseases/TickborneDiseases-P.pdf>
10. Cepeda Másmela, O. A., & Zapata Neira, J. S. (2011). Detección serológica por Elisa indirecta de hemoparásitos y *Dirofilaria immitis* en caninos en Bogotá, Colombia.

11. Cervantes, A. J. (2014). Piroplasmosis canina. Obtenido de repositorio.uaaan.mx: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7132/JORGE%20LUIS%20CERVANTES%20AGADO.pdf?sequence=1>
12. Codner, E. C., & Farris-Smith, L. L. (1986). Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(1), 47-50.
13. Dantas-Torres, F. (2015). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. *International Journal for Parasitology: parasites and wildlife*, 4(3), 452-461.
14. Dawson, J. E., Stallknecht, D. E., Howerth, E. W., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W. R., ... & Childs, J. E. (1994). Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2725-2728.
15. Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., ... & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2145-2165.
16. Ferrer, C., Colom, F., Frasés, S., Mulet, E., Abad, J. L., & Alió, J. L. (2001). Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 S ribosomal DNA typing in ocular infections. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2873-2879.
17. Foglia, M. V., Cappiello, S., & Oliva, G. (2006). Tick-transmitted diseases in dogs: clinic pathological findings. *Parassitologia*, 48(1), 135-136.
18. Fritz, C. L. (2009). Emerging tick-borne diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(2), 265-278.
19. Galaviz-Silva, L., Pérez-Treviño, K. C., & Molina-Garza, Z. J. (2013). Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo León, Mexico, and their association with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Experimental and Applied Acarology*, 61(4), 491-501.

20. García Rossatty, A. L. (2013). Determinación de *Babesia canis canis* en perros que habitan en Refugio Aware (Animal Welfare Association-Rescue/Education) en Sumpango, Sacatepéquez mediante la técnica de frote sanguíneo (Doctoral dissertation, Universidad de San Carlos de Guatemala).
21. Greig, B., & Armstrong, J. (2008). Anaplasmosis granulocitotrópica canina (infección por *A. phagocytophilum*). *Enfermedades infecciosas del perro y el gato (3a ed., p. 1560)*. Argentina: Inter-Médica SAICI.
22. Guevara P. Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. Red de Innovación Tecnológica IDMM. 2004; 1-102.
23. Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296.
24. Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., & Shaw, S. (2004). Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(11), 4488-4490.
25. Hongo, I., & Bloch, K. C. (2006). *Ehrlichia* infection of the central nervous system. *Current treatment options in neurology*, 8(3), 179-184.
26. Huerto-Medina, E., & Dámaso-Mata, B. (2015). Factores asociados a la infección por *Ehrlichia canis* en perros infestados con garrapatas en la ciudad de Huánuco, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32, 756-760.
27. Ismail, N., Bloch, K. C., & McBride, J. W. (2010). Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in laboratory medicine*, 30(1), 261-292.
28. Kaufman, W. R. (2010). Ticks: physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks and tick-borne diseases*, 1(1), 11-22.
29. Lantos, P., & Krause, P. J. (2002, October). Ehrlichiosis in children. In *Seminars in pediatric infectious diseases* (Vol. 13, No. 4, pp. 249-256). WB Saunders.
30. Lira-Amaya, J., Polanco-Martínez, D., Castañeda-Arriola, R., Ramos-Aragón, J., Lara-Hernández, E., & Preciado-De la Torre, J. (2017). Prevalencia serológica y molecular de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en búfalos de agua mantenidos en zonas de alta incidencia de garrapatas. *Fol Entomol Mex*, 4, 627-32.

31. Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 40(6), 1121-1140.
32. McBride, J. W., & Walker, D. H. (2011). Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert reviews in molecular medicine*, 13, e3.
33. Moumene, A., & Meyer, D. F. (2016). *Ehrlichia's* molecular tricks to manipulate their host cells. *Microbes and infection*, 18(3), 172-179.
34. Nava, S., Venzal, J. M., Terassini, F. A., Mangold, A. J., Camargo, L. M. A., & Labruna, M. B. (2010). Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. *Journal of Parasitology*, 96(6), 1089-1101.
35. Oteo Blanco, J. R., & Cucalón, V. I. (2001). ¿Podemos prevenir las enfermedades transmitidas por garrapatas? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 19(10), 509-513.
36. Oteo, J. A., & Brouqui, P. (2005). Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23(6), 375-380.
37. Paddock, C. D., & Yabsley, M. J. (2007). Ecological havoc, the rise of white-tailed deer, and the emergence of *Amblyomma americanum*-associated zoonoses in the United States. *Wildlife and emerging zoonotic diseases: the biology, circumstances and consequences of cross-species transmission*, 289-324.
38. Parra, M. H., Peláez, S. L., Segura, C. F., Arcos, J. C., Londoño, A., Díaz, E., & Vanegas, M. A. (1999). Manejo integrado de garrapatas en bovinos. *Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias*, 2, 72-77.
39. Pérez, T. M., Guzmán-Cornejo, C., Montiel-Parra, G., Paredes-León, R., & Rivas, G. (2014). Biodiversidad de ácaros en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 399-407.
40. Ramírez, M. A. (2001). Otras zoonosis transmitidas por garrapatas: babesiosis y ehrlichiosis. Lyme and related diseases. In *First tick-borne Diseases Conference, University of Hull, Scarborough, UK*.
41. Rikihisa, Y. (1999). Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*. *Microbes and infection*, 1(5), 367-376.

42. Rocha, J. F., Martínez, R., López-Villalobos, N., & Morris, S. T. (2019). Tick burden in *Bos taurus* cattle and its relationship with heat stress in three agroecological zones in the tropics of Colombia. *Parasites & vectors*, *12*(1), 1-11.
43. Rodríguez-Vivas, R. I., Albornoz, R. E. F., & Bolio, G. M. E. (2005). *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Veterinary Parasitology*, *127*(1), 75-79.
44. Rodríguez-Vivas, R. I., Mata-Mendez, Y., Pérez-Gutierrez, E., & Wagner, G. (2004). The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. *Tropical animal health and production*, *36*(2), 135-143.
45. Ruiz Barahona, A. G., & Salinas Almendárez, C. J. (2017). Estudio comparativo entre las técnicas, Frotis sanguíneo, Inmunocromatografía y Biología molecular para la identificación de *Ehrlichia canis* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
46. Silva-Sánchez, C. J., Arévalo, C., Vilorio, N., & Romero Palmera, J. (2016). Prevalencia de hemoparásitos en aves silvestres, en zona oriental del estado Falcón, Venezuela 2013-2015. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, *56*(2), 172-184.
47. Starkey, L. A., Barrett, A. W., Chandrashekar, R., Stillman, B. A., Tyrrell, P., Thatcher, B., ... & Little, S. E. (2014). Development of antibodies to and PCR detection of *Ehrlichia* spp. in dogs following natural tick exposure. *Veterinary microbiology*, *173*(3-4), 379-384.
48. Stegeman, J. R., Birkenheuer, A. J., Kruger, J. M., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *222*(7), 959-963.
49. Tamez González, A. (2018). Detección de *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia rickettsii* en garrapatas de la zona metropolitana de Monterrey mediante PCR (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
50. Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J. P., & Frankena, K. (2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, *148*(18), 567-572.
51. Vasquez-Espinoza, R., & Beck, D. L. (2015). Detection of *Borrelia* and *Ehrlichia* in *Rhipicephalus sanguineus*.

52. Vega MA Current importance of cattle hemoparasite diseases. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal, Garrapatas y Enfermedades que Transmiten. Octubre 9-11, Oaxtepec, Morelos. SAGAR; 1991. p.144-50.