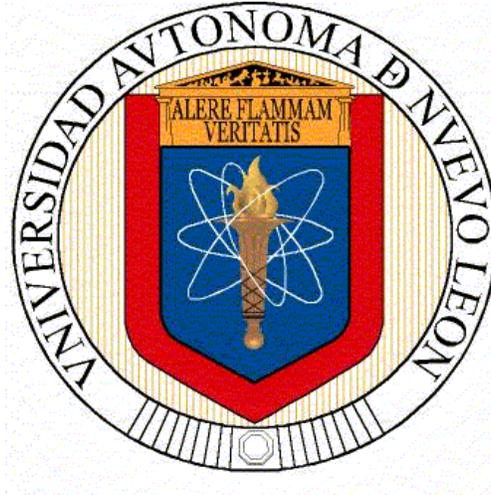


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**DETECCIÓN DE *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*
EN GARRAPATAS RECOLECTADAS DE PERROS EN MONTERREY,
NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**QUE PRESENTA
ROBERTO TAMEZ GONZÁLEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

DICIEMBRE 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y FACULTAD DE
AGRONOMIA
POSGRADO CONJUNTO



DETECCIÓN DE *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*
EN GARRAPATAS RECOLECTADAS DE PERROS EN MONTERREY,
NUEVO LEÓN, MÉXICO.

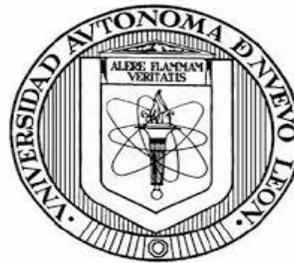
TESIS
QUE PRESENTA
ROBERTO TAMEZ GONZALEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L., MEXICO

DICIEMBRE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y FACULTAD DE
AGRONOMIA
POSGRADO CONJUNTO



**DETECCIÓN DE *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*
EN GARRAPATAS RECOLECTADAS DE PERROS EN MONTERREY,
NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

TESIS
QUE PRESENTA
ROBERTO TAMEZ GONZALEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L., MEXICO

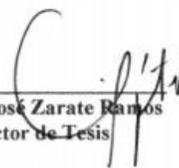
DICIEMBRE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y FACULTAD DE
AGRONOMIA



DETECCIÓN DE *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* EN
GARRAPATAS RECOLECTADAS DE PERROS EN MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO.

Aprobación de tesis por el comité particular de


Dr. Juan José Zarate Ramos
Director de Tesis


Dra. María Guadalupe Gordillo Pérez
Co-Directora de Tesis


Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Co-Directora de Tesis

ESCOBEDO, N.L., MEXICO

DICIEMBRE DE 2015

DEDICATORIA

A mis padres, por mostrarme el camino que debo seguir y darme la oportunidad de servir a la humanidad.

A mi esposa, que con sus consejos me han mostrado el camino más prudente para llegar a este momento.

A mis hijos que son mi motor para salir adelante de todos los obstáculos que se presenten en esta vida.

A mis maestros de la maestría y programa conjunto Veterinaria-Agronomía por darme una porción de su experiencia y conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L. por volverme a abrir sus puertas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan José Zarate Ramos por haber aceptado ser mi asesor de tesis y compartir sus amplios conocimientos nuevamente con un servidor.

A la Dra. María Guadalupe Gordillo Pérez por permitir que este sueño se haya convertido en realidad, confiar en mí y prestarme sus instalaciones de su laboratorio a cargo.

Al la Dra. Diana Elisa Zamora por su comprensión, enseñanza y esmero para dedicarme un momento de su tiempo y apoyarme en la realización de este trabajo.

A la Dra. Rocío Ortiz López por ser parte de la decisión para avanzar hasta éste momento.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
16S	Porción ribosomal 1
°C	Grados Centígrados
CDC	Centro de Control de Enfermedades
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
ml	Mililitro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ECM	Eritema Crónico Migratorio
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EGH	Erliquiosis Granulocítica Humana
EMC	Erliquiosis Monocítica Canina
dNTP's	Desoxirribonucleotidos trifosfatados
pb	Pares de bases
rrf	Porción ribosomal 5 S
rrs	Porción ribosomal 16 S
rrl	Porción ribosomal 23 S
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
RPM	Revoluciones por minuto
BSK II	Medio de cultivo Barbour-Stonner-Kelly II
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
Osp A	Proteína de superficie A
Osp B	Proteína de superficie B
Osp C	Proteína de superficie C
sp	Especie
spp	Especies

INDICE DE TABLAS

Tabla.1	Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación de <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Ehrlichia chaffeensis</i> y <i>Borrelia burgdorferi</i>	51
Tabla 2.	Colonias muestreadas y con presencia de patógenos en oriente y poniente de la ciudad de Monterrey.....	56
Tabla 3.	Colonias muestreadas, analizadas y especificando el patógeno hallado en ellas.....	58
Tabla 4.	Localización geográfica de vectores, género de garrapatas positivas y patógenos encontrados en las colonias de Monterrey, Nuevo León, México.....	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Formas de transmisión de <i>Ehrlichia canis</i> en el ciclo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	27
Figura 2.	Ciclo peridoméstico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	31
Figura 3.	Ejemplares de garrapatas colectadas en Monterrey, Nuevo León.....	52
Figura 4.	PCR para la amplificación del gen fla de <i>Borrelia burgdorferi</i>	53
Figura 5.	PCR para el gen 16S ARN <i>Ehrlichia</i> spp.....	54
Figura 6.	PCR anidado para el género de <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	55
Figura 7.	Amplificación por PCR anidado para <i>Ehrlichia canis</i>	55
Figura 8.	Localización de las garrapatas colectadas (estrellas amarillas) y positivas a los patógenos esperados.....	59

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1.	Garrapatas muestreadas, analizadas y especificando el patógeno hallado en ellas.....	57
------------	--	----

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	V
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1. Enfermedad de Lyme.....	5
3.2. Características clínicas de la enfermedad de Lyme.....	7
3.3. Agente etiológico: <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	8
3.4. Morfología, microbiología y secuencia génica.....	9
3.4.1 Morfología.....	9
3.4.2 Microbiología.....	10
3.4.3 Secuencia génica.....	10
3.5. Taxonomía de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	11
3.6. Filogenia de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	12
3.7. Epidemiología de <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	13
3.8. Distribución geográfica en México de <i>Borrelia burgdorferi</i>	13
3.9. Ixodidos presentes en México que transmiten <i>Borrelia burgdorferi</i>	14
3.10. Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	14
3.11. Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus boophilus microplus</i>	15
3.12. Vectores potenciales de <i>B. burgdorferi</i>	16
3.13. Insectos vectores de <i>B. burgdorferi</i>	17
3.14. Reservorios primarios de <i>B. burgdorferi</i>	17
3.15. Ciclo silvestre de transmisión de <i>B. burgdorferi</i>	18
3.16. Ciclo peridoméstico de transmisión de <i>B. burgdorferi</i>	18
3.17. Epidemiología en México.....	19

3.18. Enfermedad de Lyme en personas mexicana.....	20
3.19. Genoespecies identificadas en México.....	20
3.20. Detección molecular de las genoespecies de <i>B. burgdorferi</i> sensu lato a partir de garrapatas.....	21
3.2. Erliquiosis Monocítica Canina por <i>Ehrlichia canis</i>	
3.2.1. Erliquiosis monocítica canina.....	21
3.2.2. Características clínicas de la Erliquiosis monocítica canina.....	22
3.2.3. Filogenia.....	23
3.2.4. Agente etiológico: <i>Ehrlichia canis</i> sensu lato.....	23
3.2.5. Morfología, estructura y secuencia génica.....	24
3.2.6. Epidemiología de la Erliquiosis Monocítica Canina.....	25
3.2.6.1 Epidemiología de <i>Ehrlichia canis</i> en México.....	25
3.2.7. Distribución en Mexico.....	26
3.2.8. Vectores, reservorios y ciclos de transmisión.....	26
3.2.9. Detección molecular de <i>Ehrlichia canis</i> en garrapatas.....	27
3.2.10. Taxonomía de <i>Ehrlichia canis</i>	28
3.2.11. Distribución geográfica en México de <i>Ehrlichia canis</i>	29
3.2.12. Ixodidos presentes en México que transmiten <i>Ehrlichia canis</i>	29
3.2.13. Reservorios primarios de <i>Ehrlichia canis</i>	29
3.2.14. Ciclo silvestre de transmisión de <i>Ehrlichia canis</i>	30
3.2.15. Ciclo peridoméstico de transmisión de <i>Ehrlichia canis</i>	30
3.2.16. Características clínicas de la Erliquiosis Monocítica Canina.....	31
3.2.16.1. Sintomatología.....	31
A. Fase Aguda.....	34
B. Fase Subclínica.....	34
C. Fase Crónica.....	34
3.2.17. Hallazgos en órganos y tejidos.....	35
3.2.17.1 Hígado.....	35
3.2.17.2 Bazo.....	36
3.2.17.3 Sistema linfático.....	37
3.2.17.4 Sistema nervioso central.....	38
3.2.17.5 Sistema oftalmológico.....	39
3.2.17.6 Sistema cardiovascular.....	40
3.2.17.7 Sistema pulmonar.....	40
3.2.17.8 Sistema renal.....	41
3.2.18. Diagnóstico de Erliquiosis Canina.....	42
3.3. Erliquiosis granulocítica humana por <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	
3.3.1. Definición de Erliquiosis granulocítica humana.....	42
3.3.2. Características clínicas de la Erliquiosis granulocítica humana.....	43
3.3.3. Agente etiológico.....	44
3.3.4. Epidemiología.....	44
3.3.5. Distribución mundial.....	45
3.3.6. Vectores, reservorios y ciclo de transmisión.....	45
3.3.7. Detección molecular de <i>E. chaffeensis</i> en garrapatas.....	46
3.3.8. Prevención.....	46

4. HIPÓTESIS.....	46
5. OBJETIVO GENERAL.....	47
6. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	47
6.1. Analizar la presencia de <i>Borrelia burgdorferi</i> en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR.....	47
6.2. Determinar la presencia de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> en garrapatas extraídas de perros por la técnica de PCR.....	47
6.3. Analizar la presencia de <i>Ehrlichia canis</i> en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR.....	47
6.4. Identificar el género de las garrapatas positivas para la presencia de los patógenos analizados.....	47
6.5. Obtener la incidencia para cada uno de los patógenos estudiados.....	47
6.6. Determinar los puntos geográficos de zonas positivas para los patógenos en estudio.....	47
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
7.1. Sitio del estudio.....	47
7.2. Recolección de muestras.....	48
7.3. Identificación taxonómica de las garrapatas.....	48
7.4. Extracción de ADN a partir de las muestras colectadas.....	49
7.5. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	50
7.6. Análisis estadístico.....	51
8. RESULTADOS.....	52
8.1. Identificación taxonómica de las garrapatas colectadas.....	52
8.2. Determinación de la presencia de <i>Borrelia burgdorferi</i> , en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR.....	53
8.3. Determinación de la presencia de <i>Ehrlichia spp</i> , <i>Ehrlichia canis</i> y <i>Ehrlichia chaffeensis</i> en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de la PCR y PCR anidado.....	54
8.4. Ubicación de las colonias y estimación de resultados positivos de acuerdo al sector oriente y poniente de la ciudad.....	56
8.5 Análisis de resultados.....	60
9. DISCUSIÓN.....	61
I. Detección molecular de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>.....	60
1. Presencia de <i>Borrelia burgdorferi</i> en las garrapatas.....	61
2. Número y especie de las garrapatas infectadas con <i>Borrelia burgdorferi</i>	62
3. Grado de alimentación de los ejemplares infectados por <i>Borrelia burgdorferi</i>	62
4. Distribución de las garrapatas infectadas por <i>Borrelia burgdorferi</i>	62
5. Número de garrapatas infectadas por mes, según su variación estacional.....	63

II. Detección molecular de <i>Ehrlichia canis</i>	63
III. Detección de <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	63
1. Prevalencia y distribución de <i>Ehrlichia chaffeensis</i> en las garrapatas.....	63
2. Distribución temporal de la infección por <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	64
10. CONCLUSIONES	65
11. BIBLIOGRAFIA	67

1. RESUMEN

Las enfermedades que son transmitidas por garrapatas han alcanzado niveles epidemiológicos altos en algunas zonas geográficas como Europa y los Estados Unidos, en nuestro país desde principios de los 90's se tenían reportes como es el caso de la enfermedad de Lyme, también los casos de erliquiosis canina se incrementaron, a diferencia de la presencia de la erliquiosis humana la cual ha sido recientemente diagnosticada, sin embargo, dentro del ciclo biológico de cada patógeno se encuentran inmersos varios factores como la fauna existente en el área y los vectores endémicos que habitan el lugar en donde algunos de ellos pueden tener una alta posibilidad para diseminar microorganismos. En este trabajo utilizamos la metodología de la PCR para determinar la incidencia de *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en 400 garrapatas, encontrándose que el género *Rhipicephalus* spp tienen la capacidad de albergar y transmitir a diversos agentes patógenos. *Ehrlichia canis* es el agente causal de la erliquiosis canina, enfermedad altamente distribuida en el mundo y su principal vector es la garrapata café del perro, en este trabajo encontramos una proporción significativa de este vector para la transmisión de diferentes bacterias, encontrando hasta 3 en una misma garrapata, así como la presencia de *Ehrlichia chaffeensis* en este género de artrópodo dando un giro inesperado debido a que es el primer reporte de la presencia de este microorganismo y además, es el primero en reportar a *Borrelia burgdorferi* en *Rhipicephalus boophilus microplus* en nuestro país y en nuestro estado.

2. INTRODUCCION

Las enfermedades zoonóticas poseen la cualidad de establecerse en algunos mamíferos y aves con la ayuda de vectores hematófagos los cuales influyen en su diseminación geográfica, debido a las condiciones climáticas y el establecimiento de factores como fauna que interviene en el ciclo biológico de las enfermedades al ser parasitados por las fases larvarias de estos vectores. La borreliosis de Lyme, la erliquiosis monocítica canina y la erliquiosis granulocítica en humanos son enfermedades que son consideradas emergentes en ciertas poblaciones y localidades geográficas y por su severidad patológica son de suma importancia en la salud pública. La presencia de factores determinantes como el clima, fauna endémica, zonas boscosas cercanas que desarrollan un incremento en la presencia y prevalencia de vectores hematófagos ha preponderado directamente la incidencia de patologías debido a la inoculación de bacterias a través de estos portadores. *Borrelia burgdorferi* y *Ehrlichia chaffeensis* son microorganismos que han sido reportados en los vectores y pacientes de diferentes latitudes como Estados Unidos, Europa (Rudenko, et al., 2013) o México (Gordillo, et al., 1999) y *Ehrlichia canis* ha sido reportada en varios países latinoamericanos como México y Venezuela.

Reportes científicos han constatado la aparición de enfermedades infecciosas que son transmitidas por la inoculación de bacterias, rickettsias, protozoarios y virus a través de vectores hematófagos, estos artrópodos e insectos al infestar animales enfermos adquieren microorganismos incluso en etapas muy tempranas y al continuar su ciclo migran a otros individuos de especies diferentes, transfiriéndolos a nuevos hospederos donde fácilmente se adaptan sus mecanismos fisiológicos e inmunológicos logrando su replicación.

Padecimientos como la enfermedad de Lyme (Tamez., 1994), enfermedad de las montañas rocallosas, anaplasmosis granulocítica, enfermedad por rasguño de gato, babesiosis, erliquiosis (Perez, Bodor, Zhang, Xiong, & Rikihisa, 2006; Smetanova, Schwarzova, & Kocianova, 2006) tularemia (Petersen,

et al., 2004), son solo algunas que se han convertido en patologías zoonóticas transmitidas por inoculación de garrapatas con mayor incidencia en el mundo. Trabajos de diversos autores han comprobado que a partir de la transmisión de los agentes etiológicos éstos pueden permanecer en piel desplazándose a distintos órganos. En el caso de *Borrelia burgdorferi*, provoca lesiones de tipo immuno-inflamatorio produciendo un proceso que anteriormente se conocía como eritema crónico migratorio o ECM y actualmente es denominado ojo de toro (Bull's eye). Este signo patognomónico es considerado como el inicio de la enfermedad, (Gordillo-Perez, et al., 2007). Esta patología puede evolucionar a formas muy graves neurológicas y en el 60% de los pacientes sin tratamiento evolucionan al estadio crónico provocando secuelas e incapacidad, y en un porcentaje puede provocar la muerte (Eskow, Rao, & Mordechai, 2001) debido a que compromete órganos y sistemas como el nervioso central, ojos, corazón y riñones, (Tamez González Roberto, 1992); en nuestro país se han diagnosticado numerosos casos a lo largo de los últimos 20 años, cuando comenzaron las primeras investigaciones para reconocer su presencia en México (Carlos M. Arroyave, 1994). Actualmente existen diversos investigadores que se han abocado a señalar la presencia de este padecimiento en nuestro país, mas sin embargo han pasado por alto a la fauna silvestre (Juricova & Hubalek, 2009), incluyendo y la fauna propia de ciudad, (Gal, et al., 2007), como transporte vectorial de garrapatas portadoras de microorganismos, (Illoldi-Rangel, et al., 2012). Ya se han reportado en nuestro país gracias a estudios epidemiológicos, (Gordillo-Perez, et al., 2009) y al empleo de nuevas técnicas diagnósticas de laboratorio. Debido a que los vectores de estos padecimientos requieren un ciclo biológico estacional y condiciones climáticas óptimas que solo en ciertas regiones geográficas están presentes, en México debemos estar alerta ya que al compartir frontera geográfica con Estados Unidos, (Billings, Rawlings, & Walker, 1998) donde se han estudiado frecuencias y se ha confirmado la presencia en hospederos silvestres y diferentes vectores los cuales son incluidos en la diseminación de éstas infecciones, se sabe que las fases inmaduras de garrapatas como las larvas y ninfas pueden ser transportadas a latitudes distantes del origen endémico de los padecimientos al infestar aves

migratorias (Duneau, et al., 2008), (Reed, Meece, Henkel, & Shukla, 2003) y alcanzar la fase adulta ya en territorio ajeno a su lugar de eclosión y propagar los agentes infecciosos en fauna silvestre, animales domésticos y el ser humano. La finalidad de este trabajo fue determinar la presencia de los patógenos *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* y determinar su distribución en el municipio de Monterey para contar con un antecedente que permita la toma de decisiones y estar preparados para posibles brotes futuros en nuestro país.

3. ANTECEDENTES

3.1. Enfermedad de Lyme.

Una de las más populares enfermedades que son transmitidas por garrapatas y que ha tomado auge en la última década es la borreliosis de Lyme que ha tomado gran importancia por su extensa distribución y la gravedad de sus manifestaciones clínicas. Desde su descripción a principios de 1975 por el Dr. Alan Steere, (Steere, et al., 1977) y el aislamiento de su agente etiológico, la espiroqueta denominada *Borrelia burgdorferi*, (Burgdorfer, et al., 1982), la enfermedad de Lyme se ha convertido en la infección transmitida por artrópodos más frecuentemente diagnosticada en Estados Unidos, registrándose más de 15.000 afecciones anuales, (Orloski, Hayes, Campbell, & Dennis, 2000), en Europa se ha vuelto también una patología recurrente en los diagnósticos, estimando su prevalencia en 50.000 casos cada año, (O'Connell, Granstrom, Gray, & Stanek, 1998).

Algunos padecimientos relacionados a la espiroquetosis de Lyme se tienen reportados desde principios de siglo pasado donde en el continente Europeo, (Leczinsky, 1951) se encontraron lesiones aparentes de eritema crónico migratorio, (Bruder, 1950). Décadas posteriores en los Estados Unidos un grupo de médicos encontró artritis oligoarticular en un grupo de niños y adultos en una pequeña comunidad llamada Lyme en el estado de Connecticut, quedando denominada así la enfermedad por estos primeros casos (Steere, et al., 1977); durante el año de 1978 se encontró la asociación entre la enfermedad de Lyme y la garrapata *Ixodes dammini* clasificada en ese momento como *Ixodes scapularis*, (Carey, Krinsky, & Main, 1980), (Wallis, Brown, Kloter, & Main, 1978), (Steere, Broderick, & Malawista, 1978), (Steere & Malawista, 1979). Durante los inicios de la década de los 80's el entomólogo Suizo Willy Burgdorfer quien realizaba investigaciones con enfermedades por Borrelias transmitidas por garrapatas, identificó y clasificó a *Borrelia burgdorferi* como la causante de este fenómeno epidemiológico y otorgándole su apellido en su clasificación taxonómica, en la misma década se logra aislarla de muestras de cerebro, líquido cefalorraquídeo, piel y a partir de garrapatas tanto en estadio de ninfas como en adultas. (Steere, et al., 1983). Posteriormente se incrementó la investigación para

encontrar a diversos hospederos confirmando que no solo el humano era portador de la bacteria, corroborándose por estudios epidemiológicos a los venados (Schulze, et al., 1984), roedores (Donahue, Piesman, & Spielman, 1987), perros (Magnarelli, Anderson, & Schreier, 1990), gatos (May, Bennett, & Carter, 1990), caballos (Burgess, 1988) , aves (J. F. Anderson, Johnson, Magnarelli, & Hyde, 1986), bovinos (Lischer, Leutenegger, Braun, & Lutz, 2000) y larvas de *I. scapularis* antes *Ixodes dammini*, (J. F. Anderson, Duray, & Magnarelli, 1990) también como portadores.

Aunque se ha demostrado la presencia la espiroqueta en un gran número de animales, como las ovejas (Hovmark, Asbrink, Schwan, Hederstedt, & Christensson, 1986), no se había tomado en cuenta a los animales no domésticos quienes se conoce ahora que juegan uno de los papeles más importantes en su diseminación, participando en el ciclo silvestre de la enfermedad, situación que ha sido confirmada a través del aislamiento de este patógeno en los diversos vectores. En nuestro país existen diversos estudios que han demostrado la presencia de *Borrelia* en diversos estados de México, (Feria-Arroyo, et al., 2014). En nuestra localidad desde principios de la década de los noventa se reportaron los primeros casos (Arroyave, 1994; Tamez-Gonzalez Roberto, 1992). Los agentes causantes de las enfermedades catalogadas como zoonóticas han estado presentes desde años atrás en la fauna silvestre y animales que comparten hábitat con los humanos, incluso en los vectores que las transmiten, (Anguita, Hedrick, & Fikrig, 2003). Debido a que geográficamente estamos situados en zona aledaña a cadenas montañosas y dentro de su ecosistema donde se lleva a cabo una interacción entre diferentes especies animales cuyos recorridos para conseguir alimento y agua pudiendo llegar a grandes distancias, las llegadas de aves migratorias también han sido reportadas en estos lugares. (Ogden, et al., 2008).

Estos factores dan lugar a una mezcla favorable de individuos que son portadores asintomáticos (Yabsley, Nims, Savage, & Durden, 2009) y sintomáticos de distintas entidades microbiológicas. Estudios recientes han encontrado prevalencias de diversos padecimientos que tienen como origen la

transmisión vía arácnidos hematófagos y que con el paso de los años han aumentado en su incidencia, (Galaviz-Silva, Perez-Trevino, & Molina-Garza, 2013).

3.2. Características clínicas de la enfermedad de Lyme

La Enfermedad de Lyme es un padecimiento que tiene un desarrollo multisistémico, cuando *Borrelia burgdorferi* ingresa al organismo tiene una patogenia alternativa, quizá a que la principal vía de ingreso al hospedero es la cutánea donde la inoculación hematófaga es la que tiene el porcentaje más alto para ocasionar la infección, (Berger, Johnson, Kodner, & Coleman, 1992) sin embargo la vía sexual ya es considerada otra forma de adquisición de la espiroqueta, (Puri, Shah, Julu, Kingston, & Monro, 2014). Cuando la entrada es por piel la capacidad de atravesar tejido dérmico para llegar a sistema linfático o sanguíneo es una de las capacidades que ofrece la estructura helicoidal de *B. burgdorferi*, (Wetter & Ruff, 2011).

El eritema crónico migratorio que también se ha llamado recientemente Bull's eye siendo este es el principal signo patognómico de la enfermedad de Lyme (Willenberg, Stanga, Cottagnoud, & Stucki, 2006) más sin embargo en algunos casos la infección inicial causa zonas pruriginosas, dolor de cabeza, fiebre y fatiga o un cuadro de tipo gripal con malestar en el cuello, semanas más tarde si no se ha realizado un diagnóstico preciso y sin tratamiento se presenta y artritis, en casos severos de la persistencia bacteriana se presenta cuadros neurológicos como la clásica parálisis de Bell (Bremell & Hagberg, 2011) y afecciones cardíacas como palpitaciones (Wenger, Pellaton, Bruchez, & Schlapfer, 2012) o bloqueo de los nodos (Levy & Duray, 1988), desordenes en la memoria, del sueño, hormigueo en manos o pies, (Badalian, Kravchuk, Sergovskaia, Belousova, & Minina, 1994) pero recientes estudios han comprobado que la inoculación es tan solo una de las diferentes formas por las cuales puede ser adquirida Lyme, la infección transplacentaria, el contacto con fluidos vaginal y seminal, (Middelveen-Marianne J., 2015).

El padecimiento ocasionado por *Borrelia burgdorferi* tiene antecedentes desconcentrante ya que en recientes hallazgos en un hombre momificado de aproximadamente 45 años con una antigüedad de 5300 años, que fue encontrado en el este de los Alpes en el año de 1991, dicho individuo se le bautizo con el nombre de Ötzi el hombre de hielo y cuando se analizó el ADN mitocondrial se encontró la presencia de algunas bacterias entre las cuales se exhibió a *B. burgdorferi*. Esto respalda que el origen de esta enfermedad no es del continente americano sino más bien Europeo. (Kean, Tocchio, Kean, & Rainsford, 2013).

3.3. Agente etiológico: *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Conforme a la taxonomía que presenta el género *Borrelia* y a su estudio genómico existen variantes en cuanto a las secuencias del su ADN esto quizá se deba a las modificaciones evolutivas que ha sufrido en la adaptación a los diferentes hospederos y vectores con los que realiza sinergismo para encontrar un ciclo biológico ideal, (Adaszek, et al., 2014) dentro de la gama diversa de este género encontramos alrededor de 47 especies que algunas de ellas han sido clasificadas según a su localización geográfica y de acuerdo con la sintomatología que producen ha sido incluidas en el complejo de la enfermedad de Lyme o catalogadas individualmente como generadoras de patologías diversas, (Adeolu & Gupta, 2014). *Borrelia burgdorferi* presenta una serie de proteínas de superficie que son específicas de su género. Estudios han encontrado 48 genotipos de *Borrelia* ha sido catalogada en tres grupos. La técnica molecular de la enzima S1 nucleasa ha derivado en que la cepa referencia es ATCC 35210 de la cual se han encontrado que existen 3 grupos de *Borrelia*, genéticamente similares por un gen de restrictivo en su ARN ribosomal el cual presentan las especies agrupada, algunas geno-especies han sido aisladas del continente Americano, específicamente en los Estados Unidos donde alrededor de 28 aislados bacterianos han sido consideradas solamente como pertenecientes a la causante de Enfermedad de Lyme y clasificadas en el grupo I, el grupo II que se ha encontrado en tierras europeas,

cuyo origen de especie es *Borrelia garinii* (G25) y el último hasta el momento es el grupo III que se basa en la genómica de *B. afzelii* (VS461), (Marconi & Garon, 1992).

3.4. Morfología, microbiología y secuencia génica.

3.4.1 Morfología

Las bacterias del genero *Borrelia* son unicelulares de forma helicoidal, presentando un cilindro de su membrana externa que posee de 3 a 10 giros protoplasmáticos, flexibles, aunque puede llegar hasta 30 espirales, separadas unas de otras de 2 a 4 μm ., miden entre 10 y 30 μm de longitud y 0,2-0,3 μm de diámetro. Poseen de 15 a 20 flagelos periplásmicos los cuales le dan sostenibilidad en ciertos tejidos, también llamados fibrillas axiales, fibrillas periplásmicas o endoflagelos, dirigidos hacia el centro de la célula donde se superponen; estas estructuras son las responsables de su activa y característica movilidad de rotación en contra de las manecillas del reloj, (Salazar, Rothemich, Drouin, Glickstein, & Steere, 2005), (Krupka, et al., 2007). *Borrelia burgdorferi* tiene algunas cualidades morfológicas que se han descubierto en recientes investigaciones como modificarse a forma de quiste, biofilms, y algunas otras que nos son frecuentes en la espiroquetas, (Miklossy, et al., 2008), (Brorson & Brorson, 1998).

B. burgdorferi es catalogado como el agente causal de la borreliosis de Lyme es una bacteria que pertenece al orden de las *Spirochaetales*, dentro de la familia *Spirochaetaceae* incluida en el género *Borrelia*. Actualmente la taxonomía de este patógeno ha sido modificado debido a la gama amplia que se ha hallado y a que una variedad de este género comparten similitudes genéticas entre sí, *B. burgdorferi* es un bacilo de constitución larga de forma helicoidal y conforme a ser perteneciente a las espiroquetas este patógeno presentan los característicos flagelos de las treponemas, con 7 de ellos que se hallan en su capa de peptidoglicana y la membrana externa. Por su metabolismo anaerobio se ha comprobado que pueden penetrar tejidos donde a las células propias del sistema inmunitario les es difícil de llegar encontrando diversas vías de adaptación y de evadir la respuesta inmune y la acción de sus células defensoras modificando su estructura nuclear y protoplasmática al cambiar de la forma

conocida que es la de espiroqueta a quiste o granulo, aglomerados o biofilms, conformaciones de anillos, esférulas o asteriscos (Miklossy, et al., 2008).

3.4.2. Microbiología

La estructura de su envoltura es similar a las bacterias Gram negativas, donde la única excepción es que carecen de lipopolisacáridos, sin embargo presentan abundantes lipoproteínas (Krupka et al., 2007). El empleo de diferentes técnicas de microscopia para su observación como el de campo oscuro, También pueden ser reconocidas por microscopio de luz al emplear los colorantes habituales de hematología, las tinciones de Giemsa, Wright y la impregnación con sales de plata (Agüero-Rosenfeld et al., 2005; Brooks et al., 2007). La Espiroqueta del complejo Lyme es un patógeno con un comportamiento anaerobio la cual prefiere estar en lugares donde hay la mínima cantidad de oxígeno, su capacidad replicativa fuera de un hospedero vertebrado se ve comprometida debido a que carece de algunos nutrientes básicos para ello, es por eso que esta espiroqueta crece en medios altamente nutritivos y en condiciones muy específicas como el Barbour-Stonner-Pettenkofer (Veinovic, Cerar, Strle, & Ruzic-Sabljić, 2014), antes denominada BSK II (Andiman, 1986).

3.4.3. Secuencia génica

La secuencia génica de *B. burgdorferi* sensu lato, es de tamaño pequeño lo cual expresa que su metabolismo depende de un mecanismo de tipo parasitario obligado intracelular. En él falta la maquinaria reconocida convencionalmente para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos y cofactores enzimáticos, los que tiene que obtener del hospedero, y por eso para su cultivo *in vitro* se requiere de medios químicamente complejos (Tilly, Rosa, & Stewart, 2008), (Marques, 2010).

Este genoma, descrito como inusual, está constituido por un cromosoma lineal de aproximadamente 1 Mb y numerosos plásmidos circulares y lineales, (Baril, Richaud, Baranton, & Saint Girons, 1989), (Fraser, et al., 1997), (Tilly, et al., 2008). Específicamente para *B. burgdorferi* sensu stricto se describe

un genoma de 1,521 419 pares de bases (pb) con un cromosoma lineal de 910 725 pb y 21, plásmidos, 12 lineales y 9 circulares, (Adeolu & Gupta, 2014), que en conjunto tienen un tamaño de 610 694 pb, (Fraser, et al., 1997), (Casjens, et al., 2011). La presencia de plásmidos y sus tamaños en pares de bases varía entre cepas y genoespecies, (Stewart, Byram, Grimm, Tilly, & Rosa, 2005).

A pesar de la forma atípica del genoma, la mayoría de los genes cromosómicos que se hallan frecuentemente en otras bacterias, y que codifican proteínas indispensables para replicación, metabolismo energético y mecanismos transportadores de nutrientes, sin embargo, los genes ubicados en los plásmidos son menos reconocibles y la mayoría de ellos parecen ser únicos del género *Borrelia*, siendo necesarios para el proceso infecciosos y de persistencia de la bacteria en la garrapata, (Grimm, et al., 2005) o el hospedero vertebrado, (Stewart, et al., 2005), La expresión de los genes varía según la especie de hospedero afectado, la temperatura, la ubicación en el cuerpo del hospedero y otros factores locales, y su control es diferente al de la mayoría de las Eubacterias estudiadas, (Ojaimi, et al., 2003), (Miller, Narayan, Stevenson, & Pachner, 2005).

Estas espiroquetas presentan además una organización única de los genes que codifican para las subunidades ribosómicas del ácido ribonucleico. Tienen solo una copia del gen que tiene la subunidad 16S (*rrs*) y dos copias repetidas en tándem de los genes que codifican para las subunidades 23S (*rri*) y 5S (*rrf*), (B. E. Davidson, MacDougall, & Saint Girons, 1992), (Schwartz, et al., 1993), (Ojaimi, et al., 2003). Actualmente se ha demostrado que los microorganismos que contienen los genes *rrs* se encuentran alejados de los genes *rri/rrf* que presentan una expresión de manera diferente, este fenómeno puede ser observado en *Thermus thermophilus* y el planctomiceto *Pirellula marina* (Fukunaga & Sohnaka, 1992).

3.5. Taxonomía de *Borrelia burgdorferi* sensu lato

La bacteria que causa el complejo multisistémico de la enfermedad de Lyme ha sido clasificada y pertenece al orden de la familia *Spirochaetaceae*, dentro del género *Borrelia* y de acuerdo a su

descubridor el Dr. Willy Burgdorfer se ha determinado como la especie *burgdorferi*, al pertenecer a las espiroquetas su clásica constitución de tipo helicoidal la agrupa junto a los bacilos anaerobios teniendo una similitud con las treponemas en el número flagelos que llegan a ser 7 inmersos entre la capa de peptidoglicana y su membrana externa, todas estas cualidades anatómicas de han dado la capacidad de alcanzar múltiples estructuras orgánicas del hospedero que por su longitud que se le puede apreciar es de entre 4 a 30 μ de largo y de 0.18 a 0.25 μ . siendo una candidata a potencial a poder dañar gran cantidad de tejidos, (Veinovic, et al., 2014).

3.6. Filogenia de *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

La bacteria causante de la enfermedad de Lyme se ha propagado por varias décadas en todas direcciones provocando pandemia en prácticamente todo el orbe, los reportes de este padecimiento están presentes en todas las latitudes de este planeta. Existen diversas variantes génicas de bacterias pertenecientes al género *Borrelia*. Las características principales, su forma de contagio, y su diversidad génica las ha dividido en dos grupos: Las que provocan la clásica fiebre recurrente y las del complejo de la enfermedad de Lyme (Wang, van Dam, Schwartz, & Dankert, 1999). En el complejo *B. burgdorferi sensu lato*, en el que se reconocen actualmente 20 genespecies: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, (Chao, Liu, Ho, & Shih, 2014), *B. afzelii*, (Schuler, et al., 2015), *B. valaisiana*, (Kurilshikov, et al., 2014), *B. lusitaniae*, (Norte, Alves da Silva, et al., 2015), *B. spielmani*, (Richter, Schlee, Allgower, & Matuschka, 2004), *B. japonica*, (Kaneda, et al., 1998), *B. chiliensis*, (Ivanova, et al., 2014). Estas anteriores son causantes de patologías en seres humanos y *B. andersonii*, (Mattila, Munderloh, & Kurtti, 2007), *B. tanukii*, (Hiraoka, et al., 2007), *B. turdi*, (Norte, Araujo, et al., 2015) *B. bissetii*, (Schutzer, et al., 2012), *B. sinica*, (Masuzawa, et al., 2001), *B. californiensis*, (Postic, Garnier, & Baranton, 2007), *B. yangtze*, (Postic, et al., 2007), *B. carolinensis*, (Foley, Ott-Conn, Worth, Poulsen, & Clifford, 2014), *B. americana*, (Rudenko, et al., 2009), *B. bavariensis*,

(Markowicz, et al., 2015), *B. kurtenbachii*, (Margos, et al., 2014), y *Borrelia miyamotoi*, (Adeolu & Gupta, 2014; Cochez, et al., 2015).

3.7. Epidemiología de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Borrelia burgdorferi sensu lato es la denominación que hacen los microbiólogos a la bacteria que causa un cuadro clínico determinado y que puede llegar a tener variantes génicas incluso pertenecer a otra especie y sin embargo provocar signos y síntomas específicas esto sucede con La Enfermedad de Lyme y sus diferentes cuadros clínicos atribuibles a *B. burgdorferi* que han sido estudiados en los últimos 20 años en nuestro país, tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria, encontrando en algunos estudios que el agente patógeno de este padecimiento es el responsable de estos y muchos casos clínicos que se han incluso dejado por alto en su diagnóstico definitivo, más sin embargo en algunos caso los hallazgos por pruebas como la ELISA, ELISPOT, Western Blot y la PCR han determinado su absoluta presencia en nuestro país y en nuestra localidad. (Jin, Roen, Lehmann, & Kellermann, 2013), (Derdakova & Lencakova, 2005).

3.8. Distribución geográfica en México de *Borrelia burgdorferi*.

La presencia de la Borreliosis de Lyme en México data de la década de los 90's cuando los primeros casos que fueron reportados en humanos dieron pauta a desarrollar estrategias para su diagnóstico, las primeras incidencias de este padecimiento fueron reportadas en el norte de la república Mexicana en donde las lesiones eritematosas y pruriginosas, las artralgias en manos, rodillas y cuello eran los signos primordiales que se desarrollaron en 8 individuos con edades que oscilaban entre los 7 y 65 años, estos individuos se examinaron por pruebas serológicas para determinar la presencia de anticuerpos específicos, demostrando la presencia de ellos con titulaciones que variaban de 1:100 a 1:800 de IgG considerándose portadores de la espiroqueta de Lyme, (Tamez-G. R., 1992) En años recientes al

verse incrementado en incidencias los reportes de eritemas migrans, artralgias, linfocitomas, parálisis de Bell's en niños, (Guadalupe Gordillo-Pérez & Guillermo Ramon, 2007). Se ha emprendido una búsqueda de las zonas más endémicas de este padecimiento reportándose en casi la totalidad de México, encontrándose en algunos hospederos y demostrando la presencia de *B. burgdorferi* en algunos vectores (Gordillo-Perez, et al., 2009), no solo los seres humanos presentan susceptibilidad este patógeno en nuestro país las mascotas como el perro también se ha demostrado estar inmerso en el ciclo biológico de la enfermedad de Lyme, (Tamez-Gonzalez, 1994).

3.9. Ixodidos presentes en México que transmiten *Borrelia burgdorferi*.

Existen hasta ahora pocos estudios que determinan la presencia de los vectores potenciales o competentes para pueden transmitir la bacteria de *Borrelia burgdorferi* e incluso mucho menos con otras especies de vectores o centinelas, La gran variedad de ecosistemas que presenta la ciudad de Monterrey incluyendo zonas montañosas y áreas verdes inmersas en la ciudad son un factor determinante para que las poblaciones de ectoparásitos puedan desarrollarse en un ambiente sustentable para sus necesidades de hábitat tanto peridoméstico como silvestre. La presencia de géneros como *Dermacentor*, *Rhipicephalus boophilus*, e *Ixodes*. (Illoldi-Rangel, et al., 2012). En este estudio se trató de encontrar en algunas garrapatas colectadas a partir de perros infestados presentes en la ciudad de Monterrey, (Galaviz-Silva, et al., 2013) presentando una prevalencia en al año 2007 del 6.2% en el Noreste de México, (Gordillo-Perez, et al., 2003).

3.10. Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*.

La garrapata café del perro cuyo género es *Rhipicephalus sanguineus* es uno de los artrópodos con más efecto cosmopolita, en América del sur donde se halla en la gran mayoría de los países de esta región (Dantas-Torres, Figueredo, & Brandao-Filho, 2006), en Europa se ha encontrado en varias latitudes

donde ha provocado epidemia y problemas de salud pública y veterinaria, (Dantas-Torres, Figueredo, & Otranto, 2011) y ha sido reconocida como uno de los vectores potenciales de muchos agentes patógenos, (Latrofa, Dantas-Torres, Giannelli, & Otranto, 2014), estas garrapatas tienen una alta capacidad de adaptación e incorporarse a ciclos biológicos silvestre y peridoméstico, pudiendo desarrollarse en climas tropicales y subtropicales. Algunos factores pueden ser determinantes en el éxito de vivencia y esto es determinado en los hospederos en los cuales se llegan a alojar ya que dependiendo de las variables de temperaturas determinaran su presencia o ausencia en cierta zona o área geográfica. *Rh. sanguineus* es tan adaptativa que en algunos sitios se ha logrado contabilizar hasta cuatro generaciones por año, en algunos casos la elevada temperatura ha sido un factor determinante en la agresividad para adherirse a humanos y otros animales quizás debió a la alta tasa poblacional y la búsqueda de hospederos nuevos (Dantas-Torres, 2010). Esto es un factor determinante en la diseminación de algunas zoonosis ya que la interacción misma de una o varias especies contribuye a un repunte en la incidencia de algunas de ellas. *Rh. sanguineus* se adapta perfectamente a vivir en interiores de casa habitación denominado comportamiento endofílico, las diferentes fases del desarrollo de la garrapata pueden hallarse en un mismo hospedero siendo monotrópico, sin embargo *Rh. sanguineus* puede vivir en un ciclo silvestre hallándose en refugios de piedra caliza o entre maderas. Cuando está presente en domicilios puede alimentarse del humano, lo que le da la variante de adaptabilidad, estas habilidades sugieren que el parasitismo en humanos es posible, más sin embargo los hospederos de elección son los animales domésticos como el perro. (Dantas-Torres, 2010).

3.11. Ciclo biológico de *Rhipicephalus (boophilus) microplus*

Esta garrapata que anteriormente era conocida como *Boophilus microplus*, es considerada el ectoparásito de mayor importancia en la ganadería bovina a nivel mundial, su capacidad de adaptación en diversos hospederos como caballos, asnos, ovicaprinos, cerdos, perros y algunos animales silvestres.

Rh. sanguineus boophilus microplus posee la capacidad de transmitir patógenos diversos entre los cuales *Babesia bigemina* y *B. bovis* son los que tienen más alta frecuencia para ser hallados en estas garrapatas y en forma experimental se ha demostrado la presencia de *Babesia equi*, *Anaplasma marginale* es un patógeno que produce una enfermedad llamada Anaplasmosis en bovinos y el principal vector es este Ixodido, este se distribuye en diversas partes del mundo como Asia, Australia, Madagascar, sureste de África, América del sur, México y el Caribe, hallándose en el estado de Texas y California. Este artrópodo pasa su vida en un solo hospedero los que promueve que todos sus estadios estén cercanos a este mismo anfitrión, los huevos son puestos en el medioambiente y una vez eclosionado pueden ser transportados por el viento, en verano la ausencia de alimento puede ser tolerada hasta por 3-4 meses, en invierno pueden llegar a tolerar 6 meses de inanición, las larvas suelen hallarse en zonas donde la piel es más fina como las patas traseras, caras internas de los muslos, flancos, abdomen y pecho. Al alimentarse las larvas sufren la muda hacia ninfa y en varios días de alimentación llega a estado adulto donde machos se aparean con hembras adultas, separándose estas una vez preñadas para depositar los huevecillos en grietas o piedra laja, como la mayoría de las garrapatas la hembra muere después de la ovoposición, este ciclo se puede llevar a cabo en tan solo 3 a 4 semanas, repitiendo este ciclo varias veces al año. (Lohmeyer, Pound, May, Kammlah, & Davey, 2011).

3.12. Vectores potenciales de *Borrelia burgdorferi*.

Las garrapatas que pertenecen al sub orden *Ixodida* y al phylum *Arthropoda* son los principales vectores de patógenos en el mundo, su grupo es tan grande que ha sido comparado con la familia *Culicidae* (mosquitos) por su número de ejemplares. Estos artrópodos son la causa de muchas patologías en humanos y animales debido a que pueden inocular bacterias, virus y protozoarios, (Jongejan & Uilenberg, 2004). Este orden tiene una gran importancia en la salud pública. En muchos estudios se ha encontrado a estos artrópodos como portadores de *B. burgdorferi* donde las garrapatas tienen el mayor

número de hallazgos de esta bacteria en su interior. Los géneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* son los géneros donde más frecuente se halla este microorganismo.

3.13. Insectos vectores de *B. burgdorferi*

Existen hasta el momento diversos vectores que han sido estudiados y examinados para tratar de identificar la presencia de la espiroqueta de Lyme en su interior y demostrar que son transmisores competentes de esta, (Herman-Giddens, 2014) la mayoría de los insectos y artrópodos que están implicados en la transmisión de *Borrelia burgdorferi* tiene comportamientos hematófagos, aunque las garrapatas son los vectores primarios algunos insectos como las pulgas de la familia *Siphonaptera* (Lindsay, et al., 1991), (Netusil, Zakovska, Vostal, Norek, & Stanko, 2013) y moscas de la familia *Tabanidae* y mosquitos (D. I. Kosik-Bogacka, Kuzna-Grygiel, & Gornik, 2006) pertenecientes a la familia *Culicidae* (D. Kosik-Bogacka, Bukowska, & Kuzna-Grygiel, 2002), en los cuales han sido demostrados como portadores del patógeno (R. P. Clark & Hu, 2008). Este es un campo en el cual se requiere de más estudios para demostrar cuántos y cuáles son los verdaderos portadores y dispersores de esta patología en el mundo. En México hasta ahora no se han realizado estudios para identificar y conocer algunos de estos insectos como posibles portadores y transmisores de la enfermedad de Lyme.

3.14. Reservorios primarios de *B. burgdorferi*

Los ciclos biológicos donde se ha encontrado la presencia de *Borrelia* nos ofrece información de los portadores de este patógeno, encontrando en orden de importancia a las garrapatas que actúan como principales vectores, (Danielova, Daniel, Rudenko, & Golovchenko, 2004) o insectos hematófagos en la cadena epidemiológica, en segundo plano a los pequeños mamíferos entre ellos roedores quienes participan como reservorios, (K. L. Clark, Oliver, James, Durden, & Banks, 2002), ardillas (Lane, Mun, Eisen, & Eisen, 2005), en este proceso la interacción con otras especies cercanas por su actividad en el mismo medio ambiente de los roedores están los venados, zorros, (Isogai, et al., 1994), osos, (Kazmierczak, Amundson, & Burgess, 1988) en este punto cabe nombrar a las aves como el pavo

salvaje, (Lane, et al., 2006) y algunas aves silvestres cantoras (Buker, Picozzi, Kolb, & Hatt, 2013), que son los motores de más importancia debido a que algunas especies presentan comportamientos migratorios que llegan a esparcir las fases larvarias de las garrapata que ya presentan la *Borrelia* en su interior (Anguita, et al., 2003), (Ogden, et al., 2008), (Mathers, et al., 2011).

3.15. Ciclo silvestre de transmisión de *B. burgdorferi*

Las diferentes especies de vectores que se han encontrados como transmisores de *B. burgdorferi* se han adaptado a diferentes ecosistemas y a la presencia de diferentes hospederos según la región geográfica donde al parasitar especies presentes en estas zonas cumplen con el requisito para dispersar a la Borreliosis de Lyme. Alguna literatura hace mención que existen varios insectos que son capaces de transmitir a *B. burgdorferi* y debido a esto se deberá en un futuro poner atención en algunos posibles vectores que pudieran interferir o estar ya en el ciclo biológico de esta patología y que hasta el momento no se conoce su identidad. (Netusil, et al., 2013). En nuestra localidad hacen falta estudios profundos para demostrar la actividad de algunos animales en estos ciclos silvestres, como los venados, ratones, ardillas, zarigüeyas, mapaches, tejones, coyotes y algunas aves, (Tsao, et al., 2004).

3.16. Ciclo peridoméstico de transmisión de *B. burgdorferi*

Algunos géneros de garrapatas en las que se ha demostrado la presencia en su organismo de la *Borrelia* de Lyme se encuentran *Rh. sanguineus*, *Rh. boophilus microplus*, *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp., *Amblyomma* spp. Entre las más frecuentes dentro de nuestra región, la capacidad de poder adherirse a diferentes especies animales, incluso pudiendo parasitar al humano y transmitir patógenos. *Rh. sanguineus* por estar bien adaptada a las condiciones de clima y entorno ecológico puede establecerse cerca de las habitaciones aledañas a parques o zonas citadinas, incluso adaptándose a vivir en los domicilios donde perros habitan en el interior de estos domicilios, este comportamiento puede ser

origen a patologías por contacto hematófago convirtiéndose en un vector competente para la transmisión de *Borrelia burgdorferi*.(Connally, et al., 2009).

3.17. Epidemiología en México

El padecimiento ocasionado por la infección de *Borrelia burgdorferi* se ha determinado que tiene alrededor de 20 a 25 años presente en nuestro país, en últimos años se han visto que los antecedentes de algunos pacientes mencionan que padecen y/o recuerdan haber sufrido el parasitismo de garrapatas desde hace más de 30 años sin haber recibido un diagnóstico definitivo o incluso un aproximado de su padecimiento sintomatológico

ya que los primeros casos reportados datan de la década de los 90's, sin embargo solo algunos estudios se han realizado en ciertas zonas de México, principalmente Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, algunos otros se han llevado a cabo en el centro del país en el Distrito Federal, Quintana Roo, (Gordillo-Perez, et al., 2007) y Yucatán, Baja California (Tinoco-Garcia, 2008), sin embargo se han recolectado muestras confirmadas encontrándose casos prácticamente en todo el territorio nacional. La Borreliosis de Lyme se ha presentado en casi la mayoría de estados de la república, donde algunos de los diagnósticos confirmatorios en algunos individuos se han llevado a cabo en años posteriores a la inoculación de *B. burgdorferi*, dando lugar a proceso crónicos en estos pacientes. Estos casos se aglomeran con mayor incidencia en el noroeste de la república Mexicana, sin embargo existen pacientes humanos, animales y vectores infectados que han sido confirmados en nuestro país en lugares como el Distrito Federal (Gordillo-Perez, et al., 2003), donde la altitud jugaría un papel predeterminante para el desarrollo de los vectores, sin embargo los reportes de clínicos determinan la presencia de enfermedad de Lyme en estos lugares, algunos caso clínicos se han demostrado en diversos estados del sur de nuestro país sin embargo el CDC hace referencia a que no existe la presencia de *Ixodes scapularis* en México y esto limita la posibilidad de aceptar esta patología

abiertamente y realizar labores de consultas epidemiológicas en nuestro país. (Hamer, Hickling, Walker, & Tsao, 2014).

3.18. Enfermedad de Lyme en personas mexicanas

Borrelia burgdorferi sensu lato provoca un complejo de inflamatorio en el cuerpo de quien ha sido infectado, La enfermedad de Lyme se sabe que presenta afinidad por diversos tejidos y órganos. Encontrándose principalmente en piel, articulaciones, sistema nervioso, corazón, sistema genitourinario, desde inicios de la década de los 90's los cuadros sintomatológicos de este padecimiento han relacionado principalmente al sistema tegumentario, donde la lesión más frecuente es la *Borrelia burgdorferi* se ha localizado a lo largo del territorio de México encontrándose en diversas especies animales y de garrapatas, los humanos que han llegado a presentar sinología de la enfermedad de Lyme han sido diagnosticados con metodologías diversas como la técnica de western blot, inmunofluorescencia para anticuerpos monoclonales H5332 contra la flagelina de la espiroqueta, esto ha dado como resultado que algunas muestras de macerados de garrapatas del género *Ixodes* y al aplicar la reacción en cadena de la polimerasa punto final y PCR anidada han dado como resultado que hay pacientes que se les han hallado rastros inmunológicos principalmente en el noreste de nuestro país con una prevalencia del 6.2% en el 2003, (Gordillo-Perez, et al., 2003), aunque la sintomatología de este padecimiento es muy diferente en cada latitud donde se ha diagnosticada, esto puede representar a que esta bacteria ha logrado evolucionar en cada una de las localidades donde se ha encontrado incluso en un mismo país.

3.19. Genoespecies identificadas en México.

Hasta el momento de las muestras que se han registrado como positivas algunas de acuerdo a su historial de presentación de la enfermedad se han mandado secuenciar para determinar las similitudes génicas en la secuencia de nucleótidos entre las cepas de *B. burgdorferi* de referencias y las halladas en

nuestro país. Se está trabajando en la secuenciación de dichas muestras para determinar si enfermedad de Lyme es similar a la que se encuentra en el condado de Connecticut a la que se halla en México o particularmente en Monterrey, (Gordillo-Pérez comunicación personal).

3.20. Detección molecular de las genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato a partir de garrapatas

Existe un variedad de genoespecies diferenciadas por métodos moleculares de *Borrelia burgdorferi*, las cuales se ha comprobado que provocan el síndrome de la enfermedad de Lyme en humanos. (Girard, Fedorova, & Lane, 2011) Todas ellas han sido encontradas en muestras de diversas especies incluyendo el humano. El procedimiento para determinar la presencia de estos patógenos en el interior de un vector, es inicialmente una técnica mediante la cual se degradan la gran mayoría de las proteínas estructurales presentes en los tejidos del artrópodo y en la cual los diferentes ácidos nucleicos son conservados por dicho método, la muestra contendrá material genético de la garrapata, del hospedero que fue colectada y de los posibles patógenos que pudieran estar en ella. (Rudenko, et al., 2009). Todo este proceso es determinante para que nuestra muestra sea del todo adecuada para un buen diagnóstico. La reacción en cadena de la polimerasa nos revelará si nuestra muestra contiene fragmentos específicos para *Borrelia burgdorferi* sensu lato o sensu stricto, según la región que deseamos amplificar, dando como resultado una porción del ADN de la bacteria, algunas muestras que ha sido analizada han demostrado que existe la presencia de *B. burgdorferi* en México sin embargo hasta el momento no hay una serovariante específica o una especie genética específica para el territorio de México. (Gordillo, et al., 1999).

3.2. Erliquiosis monocítica canina por *Ehrlichia canis*

3.2.1. Erliquiosis Monocítica Canina

La enfermedad causada por la bacteria *Ehrlichia canis* es un padecimiento multisistémico la cual requiere de las garrapatas para establecerse y propagarse en una zona geográfica determinada y

convertirse en endémica o cíclica año tras año, este fenómeno está asociado principalmente a la distribución del vector. *Rhipicephalus sanguineus* es el transmisor competente para este padecimiento y se encuentra distribuido en todo el mundo y su principal hospedador es el perro doméstico. La acción infectiva de *E. canis* es producida al invadir las células del paquete blanco que le sirven de transporte para llegar a otros sistemas y órganos, *E. canis* tiene una enorme habilidad para inducir severas linfoplasmosis en los órganos que presentan estructura parenquimatosa produciendo sangrados y en las células endoteliales de tipo vascular, dando así lugar a las clásicas hemorragias presentes en este padecimiento con una prevalencia del 35 % en perros afectados y dando como resultado una gran variedad de signos clínicos al afectar el aporte sanguíneo de estos sistemas.

Al pertenecer a la categoría de las enfermedades zoonóticas que son transmitidas por garrapatas, el género *Ehrlichia canis* afecta a perros principalmente, desarrollándose como parásito intracitoplasmático obligado en células nucleadas, específicamente en monocitos. *E. canis* pertenece al grupo de las Rickettsias, (Alves, et al., 2014). En nuestro país se ha determinado que *E. canis* puede establecerse en seres humanos, (Gongora-Bianchi R.A., 1999), dando lugar a que se clasifique como enfermedad emergente en medicina veterinaria y humana. La presencia a nivel mundial de garrapatas de la familia *Ixodidae* especialmente *Rhipicephalus sanguineus*, (Fourie, et al., 2013), es un detonante por ser el principal vector, haciendo determinante que en ciertas épocas del año se incrementen los casos de esta enfermedad. En México existen pocos estudios que indican la incidencia y circulación de esta bacteria, el presente trabajo trata de establecer la relación entre garrapatas infectadas y la probable incidencia en la localidad del municipio de Monterrey, Nuevo León, México.

3.2.2. Características clínicas de la Erliquiosis monocítica canina.

La infección causada por el patógeno *Ehrlichia canis* comienza con su inoculación por medio de garrapatas que contiene la bacteria, primordialmente del género *Rhipicephalus* spp. sin embargo puede ser transmitida por algunos géneros diferentes de garrapatas, (E. M. Johnson, et al., 1998), las cuales al

tener contacto hematofago con el hospedero inocula al agente patógeno el cual habita en su tracto digestivo superior primordialmente en las glándulas salivales y al estar ingiriendo sangre efectúan un proceso de regurgitación el cual propicia la transmisión. Posteriormente *E. canis* al estar en el torrente sanguíneo e infectar a los monocitos del nuevo hospedero se transporta por este medio y usando a las células como vehículo llegando a todo los órganos blanco que pueden ser infectados, buscando principalmente los que contengan una gran cantidad de vascularización u órganos parenquimatosos, (Silveira, et al., 2015), principalmente en ojos, hígado, bazo, ganglios linfáticos, sistema nervioso central, riñones, pulmones, medula ósea y las células blancas principalmente monocitos, (Braga, et al., 2013).

3.2.3. Filogenia

En la actualidad gracias a que el avance de la biología molecular ha evolucionado en el ámbito de la microbiología se ha podido realizar diversos trabajos para poder determinar con precisión la secuencia genómica de este género de patógeno, dando lugar a una mejor comprensión de su similitud con algunas otros pertenecientes a la familia de las Rickettsias, (Siarkou, Mylonakis, Bourtzi-Hatzopoulou, & Koutinas, 2007), donde la similitud genética entre ellas difiere en algunas ocasiones por su presencia en algunas latitudes geográficas y en especies nuevas. (Parzy, Baudu, Normand, Audonnet, & Davoust, 2009). *E. canis*, (Manyarara, Tubbesing, Soni, & Noden, 2015), *E. chaffeensis*, (Nair, et al., 2014) *E. platys*, (Inokuma, et al., 2002) *E. ewingii*, (Meichner, et al., 2015), *E. muris* (D. K. Johnson, et al., 2015), principalmente.

3.2.4. Agente etiológico: *Ehrlichia canis* sensu lato.

E. canis es una bacteria gram negativa, intracelular obligada principalmente en las células de tipo mononucleares de la línea blanca. Con un periodo de incubación de 8 a 20 días para comenzar a colonizar a las células monocitos y reticuloendoteliales. (Harrus, 2015). Puede albergarse en varias

especies animales, como el perro y el humano, sin embargo *E. canis* tiene estadios en el proceso de invasión dentro del hospedero como la adhesión, internalización, proliferación intracelular, exocitosis y esparcimiento intracelular, (McBride, Zhang, Wakeel, & Kuriakose, 2011), *E. canis* tiene la habilidad de inhibir la respuesta inmune del hospedero, al inhibir las respuestas proteicas intracelulares provocando la desinformación de las rutas que le ayudan a la bacteria a proliferar en el interior de la célula, (Nethery, Doyle, Zhang, & McBride, 2007). Conforme a algunos estudios la Erliquiosis han conservado su afinidad hacia algunos tejidos y células los que siguen que algunas proteínas de superficie mantienen por generaciones esas cualidades antigénicas, (X. Zhang, et al., 2008).

3.2.5. Morfología, estructura y secuencia génica.

La bacteria *Ehrlichia canis* presenta una forma de coco con pared celular comprendida principalmente de peptidoglicana. *E. canis*, es la más pequeña de las erliquias (Mavromatis, et al., 2006), su ADN tiene forma circular, su pared celular se compone de una capa de peptidoglicana y lipopolisacáridos, tienen una delgada y ondulada membrana externa separada de la membrana citoplasmática por el espacio periplásmico, en observaciones usando el microscopio electrónico ambas formas de las erliquias tanto la cocoide y la cocobacilar también denominadas cordón denso y reticulares respectivamente, presentan una morfología con la cual estas células han sido identificadas, las cocoides o de cordón denso son pequeñas y conjugadas por dos células, su medida va desde 0.4 μm a 0.6 μm de diámetro. En contraste con las células reticuladas tienen una medida de 0.4 a 0.6 por 0.7 a 1.9 μm , cada célula bacteriana contiene un simple cromosoma en forma circular el cual consiste en 1,315,030 de nucleótidos, que predice la codificación de 925 proteínas, 40 especies de RNA estables, 17 pseudogenes, y una proporción substancial de secuencias no codificadas de un 27% características interesantes del genoma incluye un gran conjunto de proteínas con transmembranales hélices parciales y/o secuencias de signos y una unión de serina-treonina parcialmente asociada al potencial de O glicosilación que es un prominente asociación de proteínas con las interacciones entre el hospedero y el

patógeno, las células de cordón denso también una densidad mayor a los electrones localizada centralmente en la cromatina y en los ribosomas. *Ehrlichia* sp tiene uniones en su membrana externa, que promueven la formación de microcolonias y forman “moreras” o grupos de bacterias las cuales se pueden teñir con la técnica Romanovsky tomando una tonalidad azul oscuro (Paddock & Childs, 2003), *E. canis* y *E. chaffeensis* se replican dentro de los enlaces de la membrana de los fagocitos mononucleares. (Stevenson, et al., 2010).

3.2.6. Epidemiología de la Erliquiosis Monocítica Canina.

La presencia de garrapatas del género *Rh. sanguineus* es un factor de alta predisposición para la diseminación del patógeno que produce la Erliquiosis canina, tanto el vector competente como *E. canis* tienen una distribución mundial. Se encuentra distribuida en desde Estados Unidos hasta Argentina, (Cicutin, Tarragona, De Salvo, Mangold, & Nava, 2015), se ha encontrado principalmente en perros pero es capaz de afectar a gatos (Breitschwerdt, et al., 2002) y también a los humanos, (Conrad, 1989) De acuerdo el origen de la garrapata se cree que la bacteria también tiene origen en el continente africano, quizás parasitando a especies de canidos de aquella zona geográfica, (de Oliveira, et al., 2009). Las garrapatas del genero *Rh. sanguineus* pueden transmitir la bacteria *Ehrlichia canis* en todos sus estadios cuando parasitan a perros, tanto en las etapas larvarias como en las adultas, y debido a que esta bacteria posee la capacidad de realizar el ciclo transovaricamente contaminando los huevos de la nueva generación, mismos que generaran estadios larvarios infectados.

Es decir que una garrapata puede estar infectada incluso sin haberse alimentado de un animal que tenga el agente infeccioso o que este enfermo, (Harrus, 2015).

3.2.6.1 Epidemiología de *Ehrlichia canis* en México.

La Erliquiosis canina monocítica canina esta reportada en toda la república Mexicana donde principalmente en el noreste de México donde la frecuencia es mayor y el clima juega un factor

determinante para que esta enfermedad endémica se expanda anualmente. Existen estados donde la incidencia y frecuencia son mayores que en otros, sin embargo quizás existen factores como la población canina para su diseminación que puede llevar al incremento en los casos de esta patología, (Sosa-Gutierrez C.G., 2014).

3.2.7. Distribución en México.

La presencia de *E. canis* se encuentra reportada en todo el territorio nacional, debido a la fácil adquisición de diferentes metodologías diagnósticas comerciales y de su fácil observación al microscopio en un frotis sanguíneo, esta técnica ha hecho que se observe una mayor frecuencia en su diagnóstico en la práctica veterinaria en nuestro país, (Pat-Nah, Rodriguez-Vivas, Bolio-Gonzalez, Villegas-Perez, & Reyes-Novelo, 2015).

3.2.8. Vectores, reservorios y ciclos de transmisión.

Los principales transmisores de la Erliquiosis canina son las garrapatas, donde el género *Rhipicephalus sanguineus* es reconocida como el principal vector de esta, al grado de provocar epidemias en algunas épocas del año y al parasitar a los perros da lugar que se presenta una incidencia mayor de esta patología en los caninos, sin embargo se ha encontrado reportes de la afección por *E. canis* frecuente en algunos otros miembros de la familia *Canidae* como chacales, coyotes y lobos, (Amyx & Huxsoll, 1973), aunque se ha encontrado habitando a gatos domésticos, (Braga, et al., 2014), (Braga, et al., 2013), (Breitschwerdt, et al., 2002). La investigación de casos clínicos, su ubicación geográfica, y posibles factores que pudieran desencadenar reportes obligatorios como nuevos reservorios e incidencia en localidades donde no existía reporte alguno, es un desarrollo en la epidemiología de esta enfermedad y su posible control.

Los ciclos de transmisión donde las garrapatas *Rh. sanguineus* y *Rh. boophilus sanguineus* son los principales vectores competentes para la diseminación de este patógeno en poblaciones caninas de una

entidad geográfica, pudieran incluir algunos hospederos no habituales más sin embargo no hay estudios que hagan referencia a estas hipótesis. La habilidad de *Rhipicephalus* spp. para desarrollar sus fases larvianas y su reproducción en un mismo individuo sin la necesidad de hospederos secundarios es una determinante en su potencial capacidad para difundir patógenos en una población determinada, esta habilidad que tiene esta garrapata es uno de los factores que se debe de tomar en cuenta para determinar la posible lucha y realizar un calendario para la aplicación de insecticidas y productos específicos que eliminen y controlen a este patógeno.

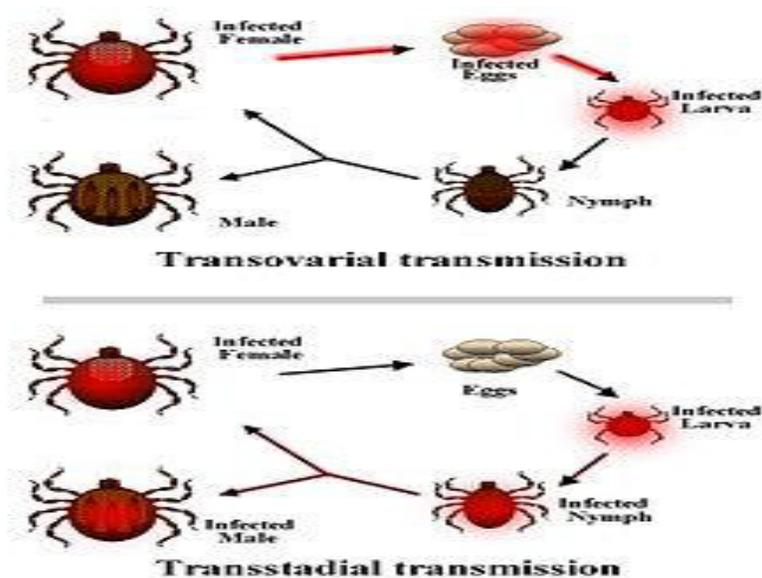


Fig. 1. Formas de Transmisión de *E. canis* en el ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*. (Bremer, et al., 2005).

3.2.9. Detección molecular de *Ehrlichia canis* en garrapatas.

Cuando se tienen especímenes de garrapatas y se quiere encontrar la presencia de patógenos es necesario conservar lo mejor posible la integridad del ADN en el cual se espera demostrar y ésta metodología se facilita con la adición de alcohol al 70% el cual tiene la acción de preservar para su

análisis posterior, este proceso es indispensable para la posible amplificación de secuencias del genoma bacteriano, (Cicuttin, et al., 2015), (Cheng & Ganta, 2008), en este trabajo la metodología empleada fue para la determinación del género *Ehrlichia* tratando de hallar la presencia del gen 16S ARNr donde el producto que origina los oligonucleótidos empleados en este trabajo producen un amplificado de un tamaño de 900 pb, (Rodríguez-Vivas, Albornoz, & Bolio, 2005).

La determinación de la presencia de *Ehrlichia canis* en muestras que son sospechosas como sangre, ojo, líquido sinovial, riñón, ganglios linfáticos, hígado, corazón, cerebro y pulmones, depende del tipo de patología a estudiar, pero el diagnóstico determinante por la técnica de PCR es la que se obtiene de sangre donde siempre es más factible hallar al microorganismo que causa este padecimiento, al encontrarse intracelularmente en los monocitos circulantes de los perros infectados, (Gal, Loeb, Yisaschar-Mekuzas, & Baneth, 2008).

3.2.10. Taxonomía de *Ehrlichia canis*.

Este patógeno pertenece al reino de las Bacteria, catalogándose en el phylum Proteobacterias, en la clase Alphaproteobacteria, en el orden Rickettsiales en la familia *Anaplasmataceae* y perteneciente al género *Ehrlichia* especie *canis*.

El género *Ehrlichia* fue inicialmente agrupado de acuerdo al tipo de célula sanguínea que llegaba a infectar, siendo las más frecuentes las de la línea celular blanca como los granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas, las clases de enfermedades han sido determinadas como granulocítica o granulocitotrófica o erliquiosis monocítica o monocitotrófica. Sin embargo estas clasificaciones pueden resultar engañosas ya que en algunas investigaciones se logró determinar la presencia de estas bacterias en diferentes tipo de líneas celulares hospederas, (Harrus, et al., 2003), *E. canis* tiene la habilidad de hospedarse en la médula ósea y esto puede significar que la bacteria puede estar viviendo en los hospederos desde el inicio de la replicación de las células sanguíneas, (Kallick, 2011).

3.2.11. Distribución geográfica en México de *Ehrlichia canis*

La presencia de diversas enfermedades transmitidas por garrapatas que hasta el momento están presentes en nuestro país se ha demostrado que la Erliquiosis canina ocupa un lugar determinante en las afecciones clínicas que son remitidas a la práctica veterinaria donde el diagnóstico y la presencia de ectoparásitos en perros y gatos, proveerá un precedente de incidencia de *E. canis*, las técnicas diagnósticas como el frotis en microscopia, diagnósticos comerciales o por laboratorio clínico ha demostrado que los casos confirmados en pacientes veterinarios y con garrapatas serán de ayuda para demostrar que el ciclo biológico de *Ehrlichia canis* está establecido en dicha localidad. México está catalogada como zona endémica de la Erliquiosis, encontrándose principalmente en Sonora, (Sosa-Gutierrez G. Carolina, 2014), Yucatán, (Pat-Nah, et al., 2015).

3.2.12. Ixodidos presentes en México que transmiten *Ehrlichia canis*

E. canis presenta un comportamiento cosmopolita al encontrarse todos los continentes y haberse adaptado a la garrapata café del perro que también se halla en todo el mundo es de esperarse que las evidencia de diversos estudios hagan referencia al sinergismo de ambas especies en nuestro país y hasta ahora el Ixodido representativo para la transmisión de *E. canis* en México es principalmente *Rhipicephalus sanguineus*, (Rubio R.M.C., 2015).

3.2.13. Reservorios primarios de *Ehrlichia canis*

Los hospederos primarios donde podemos encontrar al patógeno que produce la erliquiosis son esencialmente los perros que se encuentran directamente asociados a los lugares de ciudad donde las garrapatas están presentes y portan al patógeno *E. canis*, este mismo microorganismo por ser cosmopolita se ha encontrado en otros miembros de la familia *Canidae*, (Niehaus, Valerio, Blanco, & Chinchilla, 2012)

3.2.14. Ciclo silvestre de transmisión de *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis es un patógeno que afecta principalmente a miembros de la familia de los caninos más sin embargo se ha encontrado en felinos domésticos, (Ebani & Bertelloni, 2014), (de Oliveira, et al., 2009) y humanos, (Conrad, 1989), quizás debido a la cercanía y convivencia con los hospederos primarios como son los perros donde puede se puede encontrar a las tres fases de crecimiento en un mismo hospedero, incluso cambiando de hospedero en una misma area determinada.

3.2.15. Ciclo peridoméstico de transmisión de *Ehrlichia canis*.

La capacidad de adaptabilidad del vector *Rhipicephalus sanguineus* en áreas cercanas y propias de la casa habitación es el factor más potente con el que cuenta *E. canis* para poder incluso depender de la presencia de estos vectores para completar su replicación en el interior de ellos. Cuando este vector se encuentra en zonas aledañas a las viviendas donde se establece con las condiciones óptimas para su subsistir y que ha desarrollado la habilidad de adaptarse al ciclo silvestre y al peridoméstico es un factor determinante para que *E. canis* complete su ciclo patológico en el primer hospedero mamífero que sea inoculado, al tener todos los medios disponibles para su adaptación, la epidemiología de la erliquiosis canina en el mundo tendrá más factores para prosperar, (Carvalho, Wenceslau, Carlos, & Albuquerque, 2008). Sin embargo las garrapatas al presentar la transmisión transovárica y transtadial no requieren de algunas especies para diseminarse ni aumentar su población, esto les permite completar el ciclo en la misma garrapata, (Harrus & Waner, 2011). A continuación se muestra en la figura 2 la forma en la cual intervienen tres hospederos en este ciclo sin embargo no son necesarios por que este ciclo se puede completar en uno solo individuo, incluso sin la necesidad de hospederos.

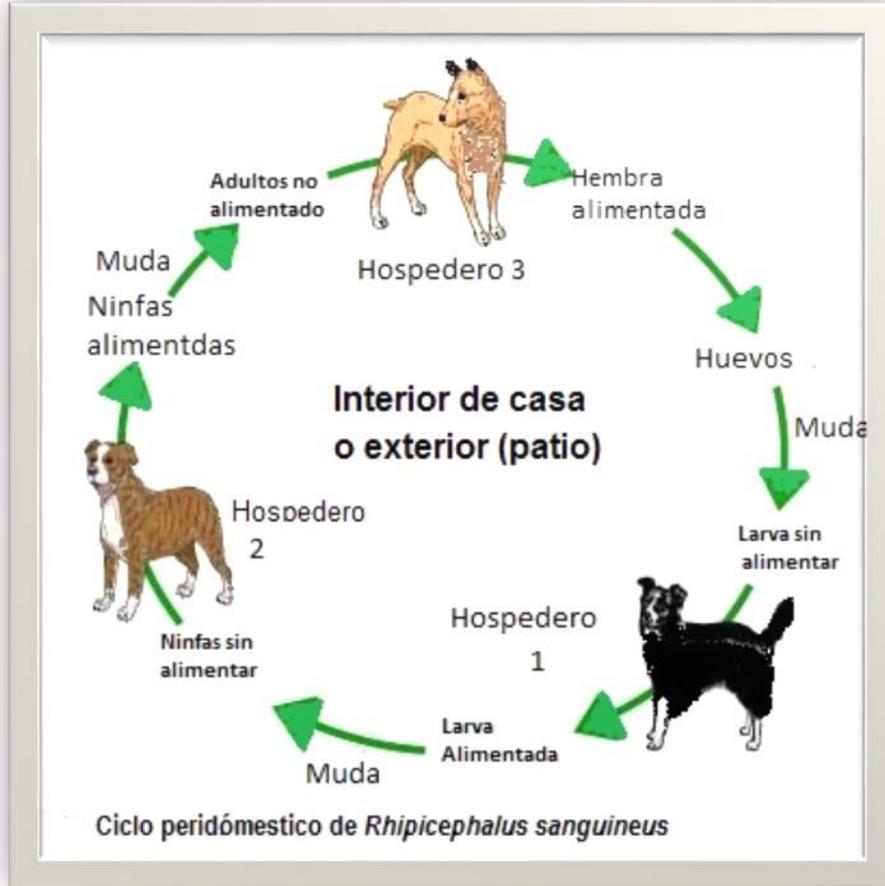


Fig. 2. Ciclo peridoméstico de la garrapata *Rh. sanguineus*.

3.2.16. Características clínicas de la Erliquiosis Monocítica Canina.

3.2.16.1 Sintomatología

El marco de la sintomatología de la erliquiosis canina es diverso, hallándose su acción patológica en distintos órganos. Especialmente durante la fase aguda la sintomatología suele ser poco específica por lo que el diagnóstico se torna en extremo difícil. Cuando no es diagnosticada en fase aguda, progresa a la forma subclínica en donde solo se encuentran alteraciones de laboratorio en perros asintomáticos. El cuadro clínico que encontramos es bastante inespecífico, presentando fiebre, pérdida de peso, apatía y anorexia, (Harrus & Waner, 2011). Aproximadamente el 40% de los casos desarrollan

linfadenomegalia, pudiendo ésta no siempre estar generalizada. También se puede encontrar esplenomegalia y hepatomegalia. Los signos típicos de la enfermedad como los cuadros hemorrágicos, (Harrus, 2015), sólo aparecen en aproximadamente el 35% de los perros con erliquiosis, (Harrus, Ofri, Aizenberg, & Waner, 1998). De todos los signos hemorrágicos observados, las petequias y equimosis en piel y mucosas, hemorragias retinianas o conjuntivales, hematuria, melena, etc. La epistaxis es el signo más frecuente. También podemos encontrar signos respiratorios como el exudado nasal, y la tos, debido a la existencia de neumonía intersticial. Son muchos los síntomas oftalmológicos encontrados en perros infectados por *Ehrlichia*, destacando especialmente la presencia de uveítis anterior frecuentemente bilateral y diferentes retinopatías. Ocasionalmente aparecen signos locomotores, especialmente cojeras intermitentes, debido a la existencia de poliartritis que suele ser causada por un depósito de inmunocomplejos a nivel articular. En estos casos se pueden detectar cuerpos de inclusión de *E. canis* en líquido sinovial. También se han descrito cuadros de polimiositis asociados a erliquiosis. Los signos neurológicos que se han relacionado con la erliquiosis canina son muy variados y pueden estar causados por meningitis debida a procesos inflamatorios o hemorragias en sistema nervioso central y periférico. Ante un cuadro agudo de fiebre, ataxia, estupor y síndrome de neurona motora superior o inferior, se debe de sospechar de erliquiosis en los diagnósticos diferenciales. Estos animales suelen presentar una rápida respuesta al tratamiento, recuperando por completo la funcionalidad neurológica, (Hartelt, et al., 2004).

En perros que presentan infección por *E. canis* es frecuente encontrar una insuficiencia renal debido a glomérulo nefritis inmuno mediada parecida a la que aparecen leishmaniasis.

La sintomatología cutánea asociada a esta enfermedad es fundamentalmente de tipo hemorrágico, (Schaefer, et al., 2008).

Al realizar un diagnóstico basado en la anamnesis siempre se deberá observar en los animales que presenten un cuadro clínico compatible con *E. canis*, el historial de infestación por garrapatas, la estancia en un área endémica de erliquiosis, zonas de climas cálidos y húmedos.

Cuando ha presentado anormalidades hematológicas trombocitopenia, anemias, de tipo no regenerativas, leucopenias y en estados crónicos graves pancitopenias por hipoplasia de las células precursoras de médula ósea, (Harrus, 2015).

Las alteraciones bioquímicas como las hiperproteinemias, valores elevados de globulinas, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. La hiperglobulinemia suele ser gammapatía policlonal, si bien se han detectado por electroforesis proteico, gammapatía monoclonal. En fases crónicas se produce nefropatía perdedora de proteínas por lo que, clínicamente, se manifiesta como proteinuria masiva, (Rondelli, et al., 2015), (Luckschander, Kleiter, & Willmann, 2003). También hay hematuria y aumento del tiempo de sangrado aun estando los valores de plaquetas en rangos normales.

Por detección de anticuerpos séricos por serología la prueba de Inmunofluorescencia de elección desde el punto de vista clínico práctico. (Harrus, Day, Waner, & Bark, 2001). Con esta técnica pueden detectarse los anticuerpos a los 7 días post infección aunque en algunos casos puede que no den un resultado positivo hasta el día 28 de la inoculación. La mayoría de los laboratorios miden niveles de IgG, valores de título superior a 20 UI se consideran positivos, pero esto depende del laboratorio con el que se trabaje. En el laboratorio con el que se ha trabajado en los casos clínicos expuestos a continuación dan título positivo a partir de valores superiores a 40 UI, (Waner, et al., 1996).

La capacidad de infectividad por parte de *E. canis* para afectar diversos órganos ha sido ilustrado en algunos estudios de la patogenia donde en 100 perros que sufrieron pancitopenia crónica en el sureste de Asia, los hallazgos histopatológicos incluyeron infiltraciones linfocíticas, monocítica y plasmáticas y manguito perivascular, estas anormalidades han sido encontradas en diversos órganos como el sistema nerviosos central, ojos, sistema linfático, bazo, hígado, riñones, vejiga, páncreas, testículos y próstata, (Hildebrandt, Conroy, McKee, Nyindo, & Huxsoll, 1973). Las lesiones petequiales y equimóticas de piel y mucosas que son observadas en animales infectados siempre fueron visibles las hemorragias microscópicas y macroscópicas de acuerdo al curso de la enfermedad se ha determinado

una variada sintomatología de signos clínicos y hematológicos, (Hildebrandt, et al., 1973). Y para su estudio se ha dividido en tres fases:

A. Fase Aguda

Tras un periodo de incubación de 8 a 20 días se inicia dicha fase y dura de 2 a 4 semanas. Se caracteriza por alteraciones hematológicas: Trombocitopenia, leucopenia y anemia leve variable, (Munhoz, et al., 2012). Otras alteraciones que se pueden presentar son pérdida de peso, anorexia, letargia, hipertermia de 41° C, linfadenomegalia, exudado oculonasal seroso o purulento, hemorragias, disnea. Debido al corto periodo de incubación se puede encontrar en algunos de estos animales una infestación evidente de garrapatas, si no han sido eliminadas todavía. En la mayoría de los casos se resuelve esta fase de forma espontánea se inicia la siguiente fase, (Smith, Sells, Stephenson, Ristic, & Huxsoll, 1976).

B. Fase Subclínica

Puede durar de meses a años. En esta fase el animal recupera el peso perdido y resuelve la hipertermia llegando a tener temperatura corporal normal. En algunos animales puede ser eliminado el parásito, si su estado inmune es competente, Aunque en la mayoría persiste, instaurándose en la fase crónica, (Eddlestone, et al., 2007).

C. Fase Crónica

Puede manifestarse como una enfermedad leve con alteraciones hematológicas y de peso irrelevantes, o por el contrario, se pueden generar cuadros con: Trombocitopenia, que den síntomas tales como palidez de mucosas, petequias, equimosis en mucosas, y/o hemorragias importantes como la epistaxis, (Hildebrandt, et al., 1973), nefropatía con eliminación de proteínas, glomerulonefritis por depósitos de complejos inmunes sobre los capilares del glomérulo, dando lugar a proteinuria que puede

llevar a la hipoalbuminemia que provoca edema ventral, disnea o tos por el edema intersticial de pulmón, (Luckschander, et al., 2003), hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía. Los signos en ojos como consecuencia de la glomerulonefritis, son la uveítis, hiperemia, retinitis, desprendimiento de retina, cambio de color de ojos y ceguera. Las alteraciones neuromusculares principales son meningitis, hemorrágica con hiperestesia, estupor y convulsiones, (de Castro et al. 2001), (Luckschander, et al., 2003). Las claudicaciones y rigidez se deben a los depósitos de complejos inmunes en las articulaciones, (Andrade, et al., 2014), (Theodorou, et al., 2015).

3.2.17. Hallazgos en órganos y tejidos

3.2.17.1 Hígado

La examinación histopatológica del hígado en perros demostraron que el 18 % tenían un acumulo de células plasmáticas en las venas centrilobulares y en las triadas de la vena porta, la actividad hepática se incrementa en forma de triada de forma leve a moderada la actividad de las enzimas, alanina aminotransferasa, lipasa pancreática y la fosfatasa alcalina, en la infección por *E. canis* patológicamente se relaciona con una infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos en infecciones experimentales, resultando en una distorsión pronunciada de las células ácinares, (Mylonakis, et al., 2014). En otro estudio experimental la degradación grasa centro lobular y de leve a moderada infiltración de células mononucleares en las zonas perivascular y periportal. La necrosis o degradación centro lobular y plasmocitosis ha sido observado en infecciones naturales en Grecia, (Mylonakis, et al., 2010).

Un caso reciente reportado de Erliquiosis canina aguda ha descrito en un perro una severa hepatitis, anorexia vomito intermitente y diarrea con una duración de 5 días en este perro la hepatitis portal fue diagnosticada con la presencia de *Ehrlichia* en los monocitos y linfocitos en el tejido hepático. La mórula de *E. canis* fue corroborada por la metodología de inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal monoespecífico para *gp36* de *E. canis* 16S ADN ribosómico, posteriormente amplificado

por PCR a partir de sangre y de tejido hepático fue 100 % similar a la cepa de Grecia. El tratamiento con doxiciclina ha sido efectivo para disminuir la fiebre y eliminar los signos clínicos, (Mylonakis, et al., 2010), (Peleg, Baneth, Eyal, Inbar, & Harrus, 2009). *Ehrlichia chaffeensis* es una *Rickettsia* relacionada genéticamente con *E. canis* que ha sido documentada como agente etiológico de casos de hepatitis aguda en humanos tanto en *E. canis* como *E. chaffeensis* su seroconversión ocurre en etapas tardías de la enfermedad esto quizá debido a la respuesta desproporcionada del hígado en virtud de que solo había pocas mórulas en el parénquima hepático, la sospecha de una respuesta por encima de lo esperado ha sido sugerida.

3.2.17.2 Bazo

El crecimiento del bazo o esplenomegalia es una de los hallazgos patológicos y clínicos de los estadios crónicos de la enfermedad. En la fase aguda de esta inflamación es no congestiva y es causada por una proliferación difusa de linfocitos, células blancas y rojas. El bazo ha sido el denominado como el mayor reservorio de *Ehrlichia canis* probablemente debido a la abundante concentración de macrófagos en este órgano, en algunos estudios también lo consideran como el último espacio antes de la eliminación de las *Rickettsias* del organismo. El bazo es la fuente de elección para fines de diagnóstico molecular en las diferentes fases. En un estudio de perros se presentó trombocitopenia dentro de los signos clínicos para erliquiosis, al realizar aspirados se pudo determinar mórulas del patógeno en el 48.5% de las muestras y al realizar pruebas de PCR se determinó la presencia en el 72.5% de DNA de *E. canis* en los aspirados, (Harrus, et al., 2011), (Faria, et al., 2010), (Peleg, Baneth, Eyal, Inbar, & Harrus, 2010).

El bazo juega un rol importante en la severidad y la fisiopatología de la enfermedad, la evidencia en el deterioro del sistema inmune en la patogénesis de esta enfermedad se observó en perros esplenotomizados versus perros infectados artificialmente con *E. canis*, (Harrus, Waner, et al., 1998),

aunque los perros a los cuales se les ha retirado su bazo desarrollaron títulos de anticuerpos en el mismo tiempo que los caninos no operados, quienes desarrollaron una forma más leve de la enfermedad. Durante la fase aguda el consumo de alimento fue más bajo en el grupo no operado que en los sometidos a esta cirugía y una elevación de temperatura más notoria en ellos, los parámetros hematológicos, hematocrito, concentración de hemoglobina y plaquetas fueron significativamente afectados en los operados, indicando que el bazo juega un rol estimado en la patogénesis de la enfermedad, (Faria, et al., 2010).

3.2.17.3 Sistema linfático

El crecimiento de los ganglios linfáticos o linfadenomegalia es un hallazgo frecuente en la fase aguda, (Harrus & Waner, 2011), este es el resultado de la hiperplasia tanto de los linfocitos T y B que responden en la producción de anticuerpos contra los antígenos de las erliquias, (Reardon & Pierce, 1981a). Uno de los principales cambios histológicos es la alteración en la arquitectura del tejido linfopoyético dando como resultado plasmocitosis y una acumulación perivascular generalizada de células linfoides y plasmáticas. Las células B, bajo una apropiada estimulación secretan gamma globulinas, la intensa plasmocitosis está relacionada con la hipergammaglobulinemia que se observa en la etapa aguda de la enfermedad, las anormalidades morfológicas se han visto que se desarrollan en perros con fase crónica, el incremento de células plasmáticas es desconocida y el aumento de linfocitos B se cree que está relacionada a la respuesta hiperinmune asociada a las lesiones y a la fisiopatología que produce la erliquiosis, (Mylonakis, Koutinas, & Leontides, 2006).

Los hallazgos en la medula ósea están relacionados con los encontrados en el conteo hematológicos en perros enfermos, reflejando la abundancia de las células plasmáticas, sin embargo algunas veces se hallan presentes pocos adipocitos. En la fase aguda se incrementan los megacariocitos en la medula ósea como respuesta a la trombocitopenia periférica lo cual indica una trombopoyesis, (Reardon &

Pierce, 1981a), se ha visto también decremento en de células mieloides y eritriodes, (Hildebrandt, et al., 1973).

El efecto de aplasia de medula ósea es el hallazgo más evidente de la fase crónica la cual es el resultado de la supresión o necrosis de la medula ósea resultante de una pancitopenia periférica severa que lleva a una debilidad generalizada debida a la anemia, a un incremento a la susceptibilidad a infecciones por la leucopenia, hemorragias extensas debido a la falla en las plaquetas y trombocitopenia, (Waner, et al., 1996).

3.2.17.4 Sistema nervioso central

En el examen histológico el 96 % de los perros con enfermedad crónica presentan plasmocitosis en las meninges con una mayor proporción de células plasmáticas y en menor grado pocos linfocitos, otras células que se encuentran pero en forma inmadura son los del sistema retículo endotelial principalmente monocitos, en la mayoría de los casos crónicos las células mononucleares forman acumulos en los alrededores de los vasos sanguíneos, siendo los sitios de predilección el tronco cerebral, el mesencéfalo y la corteza cerebral, en el 13% de los casos las hemorragias se observaron en el cerebro. Las manifestaciones clínicas más sobresalientes fueron meningitis y/o meningitis hemorrágica, en forma experimental con 14 perros todos desarrollaron meningitis, (Pancier, Ewing, & Confer, 2001), los signos de esta inflamación meníngea incluían: ataques, estupor, taxia, disfunción vestibular central o periférica, anisocoria, disfunción cerebelar, temores y también hiperestesia, en contraste cuando se realizó infección intencional con *E. ewingii*, *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* no ocurrió meningitis en estos perros, (Ewing, et al., 1997), estas meningitis fueron descritas patológicamente como leptomeningitis linfoplasmocítica acompañada de una leve infiltración celular neuroparenquimal en vasos y gliosis de astrocitos, (Carter & Miller, 1997).

3.2.17.5 Sistema oftalmológico

Uno de los principales órganos de los cuales tiene predilección la *Ehrlichia canis* son los ojos donde las afecciones oculares, estas patologías fueron documentadas en el 43% de perros afectados por *E. canis*, en estudios experimentales el 50 % de los perros desarrollaron lesiones oculares principalmente en la fase aguda y pocos en la subclínica. Un estudio retrospectivo en España reportó enfermedad ocular bilateral en el 37% de perros que se infectaron naturalmente, (Leiva, Naranjo, & Pena, 2005), encontrándose también el efecto del manguito perivascolar por células de la capa del ganglión de la retina el 43%, manguito perivascolar en la esclera inmediatamente posterior al limbo, (Hildebrandt, et al., 1973). Las lesiones reportadas se han visto que ocurren en la mayoría de las estructuras del ojo y solo algunos casos se presentan en una sola estructura afectada, (Komnenou, et al., 2007). La uveítis bilateral anterior y las lesiones retínicas son consideradas como los hallazgos más frecuentes en perros afectados naturalmente. Otras de las lesiones tales como la ulceración corneal, escleritis necrótica, disminución en la producción de lágrimas y celulitis orbital, han sido diagnósticos adjuntos a la enfermedad por erliquiosis monocitosis canina, (Komnenou, et al., 2007), (Harrus, Ofri, et al., 1998).

La mayoría de los perros infectados con *E. canis* desarrollan hipergammaglobulinemia que en la mayoría es policlonal. Algunos de estos perros en ocasiones desarrollan paraproteinemia caracterizada por gammapatía monoclonal, la hiperviscosidad del humor vítreo también se ve en casos de ceguera repentina debido a hemorragia subretinal asociada con hiperviscosidad debido a erliquiosis monocítica canina ha sido documentada, (Hoskins, Barta, & Rothschnitt, 1983).

En un estudio se comparó la relativa habilidad de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum* para inducir problemas inflamatorios en ojo y meningitis, solo *E. canis* provocó uveítis y meningitis en infecciones inducidas en perros, (Panciera, et al., 2001). Los demás microorganismos erliquiales fallaron al tratar de producir estos signos y lesiones en perros.

3.2.17.6 Sistema cardiovascular

Macroscópicamente y microscópicamente se han encontrado lesiones de origen hemorrágico en el corazón del 84% de los perros afectados con monocitosis por *Ehrlichia*, (Hoskins, et al., 1983). Las alteraciones hemostáticas pueden ser probablemente perjudiciales para las funciones cardíacas. Además ocasionalmente las células mononucleares se agregan encontrándose en la proximidad de los vasos pequeños del miocardio y en el tejido graso pericardio, (Baneth, Harrus, Gal, & Aroch, 2015). Evidencias recientes sugieren un incremento en el riesgo para daño miocárdico para perros con la afección aguda por *Ehrlichia*. Las técnicas de electrocardiograma, ecocardiograma, presión sanguínea no invasiva y medición de troponina 1 sérica cardíaca (*cTnI*) fueron evaluados en 194 perros brasileños con anomalías clínicas y de laboratorio que indicaban Erliquiosis monocítica canina, (Ferreira, et al., 2014), (Mylonakis, et al., 2010). Los perros infectados con *E. canis* tenían elevado la *cTnI* comparado con los controles negativos. Los autores concluyeron que la infección aguda con *E. canis* puede ser factor de riesgo para caninos infectados naturalmente, puntualizando que este y la anemia son los rasgos más significativos en la fisiopatología del daño miocárdico en caninos.

3.2.17.7 Sistema pulmonar

Infecciones experimentales con *Ehrlichia canis* provocan neumonía sincitial durante la fase aguda de la enfermedad, (Reardon & Pierce, 1981b). El septo alveolar en los pulmones se halló con engrosamientos e infiltraciones de macrófagos y de células mononucleares, acumulaciones focales de linfocitos y macrófagos debajo y dentro del endotelio vascular fueron encontrados en pequeñas y medianas arterias y venas. En otro estudio experimental con pastores alemanes fueron evidentes los focos pequeños de células mononucleares infiltradas en el septo alveolar, (Gonzalez, Castro Ddel, & Gonzalez, 2004). Estudios de los pulmones por microscopía electrónica y de luz de perros con infección por *Ehrlichia canis* contenían mórulas de este patógeno adheridas a la luz de la superficie de

las células epiteliales de las arteriolas y capilares, (Simpson, 1974). El microscopio electrónico reveló una relación entre las células del endotelio de las arteriolas y de células mononucleares parasitadas. Donde se encontró más mórulas fue en las bifurcaciones del endotelio de las arteriolas. Aunque *E. canis* parasita monocitos las muestras que son tomadas a partir de los pulmones estarán mejor visibles según este estudio, (Stockham, et al., 1992).

3.2.17.8 Sistema renal

En algunas investigaciones el 98% de los perros infectados naturalmente con *E. canis* se diagnosticaron histológicamente con células plasmáticas infiltradas alrededor de las venas y arterias en las uniones cortico medular, (Codner & Maslin, 1992), estudiaron las reacciones resultantes a la infección de a *E. canis*. La infiltración de células plasmáticas e histiocitos dentro de la corteza externa del riñón extendiéndose hacia la unión cortico medular los infiltrados fueron observados al igual que necrosis focal y edema perivenular y periglomerular. Patológicamente los cambios que se han encontrado en ambos túbulo renal y elementos glomerulares en perros infectados experimentalmente con *E. canis*. La proteinuria fue demostrada durante la fase aguda de la erliquiosis, el pico de pérdida de albumina en la orina fue observado en un tiempo de 2.5 a 3.5 semanas después de la infección. La examinación histológica durante la fase aguda revelo infiltrados perivenulares, linfocíticos y plasmáticos especialmente en la corteza renal, (Luckschander, et al., 2003). La tinción por inmunofluorescencia demostró de demorada a marcada de posición de anticuerpos IgG e IgM anti canino en la corteza y en la medula renal. El microscopio electrónico revelo la unión de un proceso de un podocito durante el periodo del pico de proteinuria. Los cambios fueron interpretados como mínimos en el glomérulo que es atribuible a la causa de la proteinuria que contribuye a la hipoalbuminemia observada durante la fase aguda de la erliquiosis monocítica canina. Causa deposición de amiloidosis renal, (Bonfanti, Zini, Minetti, & Zatelli, 2004).

3.2.18. Diagnóstico de Erliquiosis Canina.

La efectividad para determinar la presencia de agentes patógenos en un organismo animal confiere diversas técnicas que se pueden emplear para diagnosticar este tipo de padecimientos.

- a) Diagnostico serológico pruebas comerciales, (IDEXX ®).(Rufino, et al., 2013).
- b) Con técnica PCR (reacción cadena de polimerasa), (Kongklieng, et al., 2014).
- c) Aspiración de médula ósea o de algún órgano involucrado. Viendo la mórula de *E. canis*, (Harrus, et al., 2011).
- d) Mórula de *E. canis* en monocitos en un frotis sanguíneo en tinción Diff-Quick®, (Beraki, Olsen, & Sauer, 2012).

3.3. Erliquiosis granulocítica humana por *Ehrlichia chaffeensis*

3.3.1. Definición de Erliquiosis Granulocítica Humana

La Erliquiosis humana es una zoonosis causada por la transmisión de la bacteria *Ehrlichia chaffeensis*, la principal forma de entrada del patógeno es a través de la inoculación por garrapatas duras, donde al ingresar se aloja en macrófagos y células granuladas, replicándose y destruyendo cada célula parasitada, (Walker, et al., 2004).

Conforme a su distribución mundial las dos formas más frecuentes de zoonosis son causadas por *E. canis* y *E. chaffeensis*, los antecedentes de estos patógenos en el mundo se registraron en el continente Africano en la década de los 30's, (Donatien, Lestoquard, & et al., 1947). Sin embargo los primeros reportes en caninos se determinaron en perros pastor de la raza Alemán en la guerra de Vietnam en 1970, (Harrus & Waner, 2011).

E. chaffeensis es un patógeno obligado que se ha colocado en un conglomerado de bacterias clasificadas α -proteobacterias este grupo produce problemas patológicos en humanos y caninos, que de acuerdo a sus estructuras de su membrana y a su tinción pertenece a su a las gram negativas al igual

que todos los miembros del género *Ehrlichia* son patógenos que afectan a perros pero en años recientes se ha reconocido como enfermedad emergente encontrado casos en humanos en los cuales *E. chaffeensis* se ha determinado como causante de problemas neurológicos como dolor de cabeza, meningismo, y estados mentales alterados, histopatológicamente se ha encontrado en cerebro y meninges un infiltrado atípico de células linfoides en vasos sanguíneos y en el parénquima de los espacios de Virchow-Robin, (Grant, Hunter, & Partin, 1997). Cuando un número significativo de casos fueron reportados en perros pastores Alemanes fueron descritas las fases de esta enfermedad en aguda, subclínica y crónica. Los síntomas son similares en todas las etapas pero en la fase crónica el cuadro se exagera poniendo los síntomas de mayor apreciación que en la aguda y la subclínica. *E. canis* ha sido encontrada en todas las razas de perros pero en el pastor Alemán es donde se ha encontrado mayor porcentaje de mortalidad, (Peleg, et al., 2010). En un estudio reciente del 2006 se logró determinar la presencia de *E. canis* en pacientes humanos probando la compatibilidad de la patogenicidad al igual que *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, (Reeves, Loftis, Nicholson, & Czarkowski, 2008).

3.3.2. Características clínicas de la Erliquiosis Granulocítica Humana

La enfermedad causada por *E. chaffeensis* debido a que es un padecimiento relativamente nuevo en nuestro país es necesario aprender la presentación de su cuadro clínico en nuestro país ya que los reportes dan como principal signo que en la infección en vertebrados se halla localizada predominantemente en células fagocíticas mononucleares. La enfermedad por *Ehrlichia chaffeensis* afecta a una porción de las células blancas sanguíneas, específicamente a los monocitos polimorfonucleares, aunque se han hallado en linfocitos atípicos, promielocitos, metamielocitos y neutrófilos banda y segmentados en los cuales se llega a alojar esta bacteria llegando a encontrarse 1 o 2 mórulas en su interior interfiriendo con su metabolismo y al replicarse dentro de estos limita sus funciones en el organismo hospedero, (Paddock & Childs, 2003), provocando debilidad en el sistema

inmunológico, se han reportado casos fatales debido a los efectos secundarios en pacientes inmunocomprometidos como los que presentan cuadros de HIV positivos, (Paddock, et al., 2001).

3.3.3. Agente etiológico

Ehrlichia chaffeensis, es un cocobacilo que es conocido por su transmisión por ectoparásitos como las garrapatas principalmente, produciendo una enfermedad conocida como Erliquiosis monocítica o granulocítica humana, son cocobacilos pequeños de tinción gram negativa, la cual tiene un tropismo directo sobre los glóbulos blancos, al estar en torrente sanguíneo pueden llegar a infectar células del endotelio y células del musculo endotelial vascular, presenta un tamaño aproximado de 1 μm de diámetro, su forma de replicar es por fisión binaria, estando en órganos o en tejidos es capaz de hacer conglomerados celulares denominados biofilms que son colonias conocidas como mórulas. La bacteria *E. chaffeensis* perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, clasificada en el orden de las *Rickettsiales*, es pleomórfica pero es detectable intracelularmente en células granulocíticas, (Walker, et al., 2004).

3.3.4. Epidemiología

De acuerdo recientes estudios en cuanto a la epidemiología *E. chaffeensis* tiene una reciente documentación en referencia a reportes médicos y artículos científicos, (B. E. Anderson, Dawson, Jones, & Wilson, 1991) en los cuales desde la década pasada se ha apreciado su incidencia en algunas personas, provocando una diversidad de sintomatología y signología que ha determinado con exactitud las principales patologías que son atribuibles a este género bacteriano. Los primeros casos reportados fueron en el estado de Arkansas en Estados Unidos de Norte América donde un individuo de sexo masculino se le identificó a este patógeno que quizás fue transferido por alguna garrapata procedente de algún perro, (Dunn, et al., 1992). En los Estados Unidos *E. chaffeensis* se ha encontrado en *Amblyomma americanum*, en el año 1986 fue cuando se determinó por primera vez como Erliquiosis humana, (Mixson, Ginsberg, Campbell, Sumner, & Paddock, 2004).

3.3.5. Distribución mundial.

El primer hallazgo de este agente patógeno fue en el estado de Arkansas durante abril de 1986 se encontró un paciente que había tenido contacto con garrapatas y al realizarle estudios para determinar sus afección se encontró muchas inclusiones citoplasmáticas en células monocíticas. La incidencia de esta patología comienza a ser estudiada y se han encontrado en diferentes partes del mundo, como en China, (Cao, et al., 2000), Corea (Heo, et al., 2002), Brasil (Machado, Duarte, Dagnone, & Szabo, 2006), Venezuela (Martinez, et al., 2008), África (Pretorius & Kelly, 1998), Costa Rica (Rojas, Castillo, & Marin, 2015), en México desde el año de 1999, (Gongora-Biachi, Zavala-Velazquez, Castro-Sansores, & Gonzalez-Martinez, 1999) se demostró su evidencia. Recientes estudios están favoreciendo la evidencia de hallazgos epidemiológicos en diferentes partes del mundo donde se tenía la sospecha de casos clínicos que tenían un porcentaje alto en la similitud con los signos patognomónicos de la erliquiosis humana.

3.3.6. Vectores, reservorios y ciclos de transmisión.

En Europa se ha encontrado que uno de los principales vectores competentes para su transmisión es *Ixodes ricinus*, (Procajlo, Skupien, Bladowski, & Lew, 2011), en nuestro continente la actividad de *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma americanum* es la más ligada a la presencia epidemiológica de *E. chaffeensis*, (Killmaster, Loftis, Zemtsova, & Levin, 2014), Dentro de los reservorios citados se encuentran los coyotes (Kocan, et al., 2000), mapaches (Comer, Nicholson, Paddock, Sumner, & Childs, 2000), venados (W. R. Davidson, et al., 2001), Lémures (Williams, et al., 2002) y perros (X. F. Zhang, Zhang, Long, Ruble, & Yu, 2003).

3.3.7. Detección molecular de *Ehrlichia chaffeensis* en garrapatas.

Como se ha venido exponiendo la técnica para preservar y poder llevar a cabo la técnica de la PCR es la misma, la obtención del ejemplar a analizar deberá reunir ciertos criterios para realizar la determinación de *E. chaffeensis* en garrapatas, es un proceso en el cual la extracción del ADN del vector y su adecuado almacenamiento son de suma importancia para encontrar el fragmento de esta bacteria y así mismo diagnosticar como positivo a un paciente si este vector fuese colectado de algún humano o perro, incluso si se llevara algún estudio de epidemia de este patógeno y su recolección se haya efectuado a partir de un origen silvestre, (Luo, Zhang, Wakeel, Popov, & McBride, 2008).

3.3.8. Prevención

Los estudios preliminares que se han desarrollado alrededor del mundo donde las garrapatas son vectores potenciales de enfermedades han demostrado que la única estrategia preventiva hasta el momento es el uso de insecticidas y sustancias con efecto metabólico en la absorción de glucosa de estos artrópodos, siendo estas la forma más eficiente de reducir estas patologías en lugares endémicos de tanto de garrapatas como de patógenos. El uso de ropa adecuada la cual no permite la adhesión de garrapatas al cuerpo y promueve su fácil eliminación evitando así estas zoonosis. La propuesta de inmunizar a algunas especies se ha especulado a partir del desarrollo de la respuesta que se ha otorgado al purificar la proteína P28 de *E. chaffeensis* la cual ha dado inmunidad en ratones en forma experimental, (Crocquet-Valdes, et al., 2011).

4. HIPÓTESIS

Las garrapatas del género *Rhipicephalus* spp extraídas de perros del municipio de Monterrey están infectadas con *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis* a partir de garrapatas extraídas de perros en Monterrey Nuevo León.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 6.1. Analizar la presencia de *Borrelia burgdorferi* en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR.
- 6.2. Determinar la presencia de *Ehrlichia chaffeensis* en garrapatas extraídas de perros por la técnica de PCR.
- 6.3. Analizar la presencia de *Ehrlichia canis* en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR.
- 6.4. Identificar el género de las garrapatas positivas para la presencia de los patógenos analizados.
- 6.5. Obtener la incidencia para cada uno de los patógenos estudiados.
- 6.6. Determinar los puntos geográficos de zonas positivas para los patógenos en estudio.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Sitio de estudio

El estudio fue realizado en la ciudad de Monterrey Nuevo León, México que se encuentra localizado geográficamente en la latitud a 25° 40 ' al norte y con longitud de 100° 18 ' al oeste a una altitud de 537 metros sobre el nivel del mar cuya mancha urbana se encuentra distribuida en un radio de 580.5 km², rodeado por serranías donde se alberga fauna y flora de la región, encontrándose reportadas garrapatas de los géneros *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus boophilus* *microplus*, *Amblyomma*

cajennese, *Dermacentor variabilis*, mismas que encontramos distribuidas en nuestra colecta. En esta zona existen perros que viven y deambulan en la calle los cuales son factor de transmisión de estos vectores en diversas partes de la ciudad.

7.2. Recolección de muestras

El presente estudio está catalogado como transversal analítico, se recolectaron garrapatas de caninos callejeros remitidos al centro de control canino y felino municipal y de clínicas veterinarias de 130 colonias del sur, norte y centro de la ciudad de Monterrey, obteniendo una garrapata de cada perro que presentaba una carga parasitaria leve a media y dos de quienes presentaba un parasitosis extrema los artrópodos se almacenaron en tubos Eppendorf de 2 ml conteniendo alcohol al 70%, estas muestras quedaron identificadas con datos de procedencia de la colonia y tipo de perro y se llevaron al Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L en donde se identificó cada uno de los ejemplares a nivel de género y especie.

7.3 Identificación taxonómica de las garrapatas

La clasificación de cada una de las garrapatas fue determinada mediante los estándares y parámetros necesarios para estos artrópodos, donde el escudo y el aparato bucal son los principales indicadores que arrojan datos relevantes de estas especies en particular, por lo cual la conservación de cada uno de ellos depende una buena extracción de la piel del hospedero, tratando de siempre hacerlo con el mayor cuidado para no dañar estas estructuras de los artrópodos ya que de ello depende una buena identificación de cada ejemplar, estos hallazgos específicos se determinaron con las claves presentes en

el handbook # 485 del manual de veterinaria de “Tick of veterinary importance, Departement of Agriculture of USA”.

7.4 Extracción de ADN a partir de las muestras colectadas

Inicialmente cada uno de los artrópodos se colocó sobre papel serado para su lavado, dejándose secar a temperatura ambiente, pasándola a un tubo Eppendorf cónico donde se sometió a un macerado total tratando de dejar la menor cantidad de tejido disponible, posteriormente se realizó la extracción de ADN utilizando el kit All Tissue Lysis™, en donde el procedimiento fue modificado y perfeccionado en el laboratorio de enfermedades infecciosas emergentes del hospital siglo XXI del IMSS por la Dra. María Guadalupe Gordillo Pérez, (comunicación personal) como se describe a continuación: se adicionaron 180 µL de buffer de lisis del kit antes descrito marca Qiagen®, posteriormente se agregó 20 µL de Proteinasa K la cual se activa a una temperatura de entre 50 y 60°C, todo esta suspensión se llevó al Vortex por unos 20 segundos, posteriormente se colocó la muestra por 1 hora en baño (Block) a una temperatura de 56°C para después centrifugar a 8000 RPM durante 3 minutos, se adicionaron 200 µL de buffer ALT Qiagen® volviendo a colocar en baño Block a 70 °C por 10 minutos y agregando etanol, se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se vertió directo a los tubos columnas, los cuales se centrifugaron nuevamente a 8000 RPM por 1 minuto. Como paso final se llevó a cabo una etapa de lavado, agregando la solución AW1 500 µL procurando no tocar el anillo del orificio del tubo para evitar contaminación y después se centrifugó a 600 RPM por 1 minuto, se adicionaron 500 µL de la solución buffer AW2 y se centrifugó a 13000 RPM por 3 minutos; al retirar el tubo con el sobrenadante líquido se colocó el tubo columna en el interior de otro tubo de 1.0 ml y se agregaron 100 µL de agua bidestilada, posteriormente se centrifugó a 6000 RPM durante 1 minuto para finalmente colocar en el interior del tubo Eppendorf, el cual fue cerrado y almacenado a -20 °C .

7.5 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Inicialmente se amplificó una región del gen 16S ribosomal de *Ehrlichia* sp. Posteriormente se desarrolló la PCR anidada para determinar las dos especies del género *Ehrlichia* tanto para *E. canis* como *E. chaffeensis* con la idea de confirmar la presencia de ambas especies en las garrapatas colectadas.

La estandarización de la PCR para *B. burgdorferi* se estableció con las mismas condiciones. Para cada una de las reacciones de PCR se utilizaron 8 µM dNTP's, 25 µM Mg Cl, 10 X de Buffer PCR, 2.5 µM cada uno de los primers específicos del patógeno a analizar, 10 U de enzima Taq polimerasa y 240 ng de ADN aforando con agua MiliQ a un volumen final de 25µl.

La siguiente tabla muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para cada microorganismo, el protocolo de amplificación y el tamaño del amplificado:

Patógeno	Secuencia de los oligonucleótidos	Tamaño del amplificado	Programa de amplificación
<i>Borrelia burgdorferi</i>	FlaBcDNA flaBb 246-pb Fwd : AACACACCAGCATCACTTTCAGG 5'→3' FlaBcDNA Rev: GAGAATTAACTTCCGCCTTGAGAAGG 3'→5' (Esteve-Gassent, et al., 2015)	246 pb	94°C por 4 minutos 95 °C por 1 minutos 52 °C por 2 minutos 72 °C por 1 minuto 72 °C por 7 minutos 35 ciclos
<i>Ehrlichia</i> spp gen 16S ADN	E16S ARNr 1 Fwd ATCATGGCTCAGAACGAACG 3'→5' 2 Rev CTCATCGTTTACTCGGTGGACT 5'→3' (Vinasco, et al., 2007)	800 pb	72 °C por 1 minuto 72 °C por 7 minutos 95 °C 4 minutos 94 °C 30 segundos 45 °C 5 segundos 72 °C 1 minuto 72 °C 5 minutos 35 ciclos

<i>Ehrlichia canis</i>	15 F 5' → 3' y 842R' 3' → 5' ECC: AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC 5' → 3' CGTATTACCGCGGCTGCTGGC 3' → 5' (Vinasco, et al., 2007)	400 pb	95 °C 4 minutos 94 °C 30 segundos 45 °C 5 segundos 72 °C 1 minuto 72 °C 5 minutos 35 ciclos
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	HE-3-R TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT 3' → 5' ECA-F (EcHE1) CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA 5' → 3' (Vinasco, et al., 2007)	400 pb	

Tabla.- 1 Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación de *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*.

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 80 volts por 45 minutos utilizando el colorante SYBR Green® y visualizando bajo la luz UV del transiluminador (Quantum®).

7.6 Análisis estadístico

En el presente estudio se aplicó la estadística descriptiva, la cual resulto la más acertada para determinar con los datos recabados los porcentajes de garrapatas infectadas y positivas a la prueba de PCR para cada uno de los patógenos determinando la incidencia de estos patógenos.

8. RESULTADOS

8.1 Identificación taxonómica de las garrapatas colectadas

Se recolectaron un total de 400 garrapatas, provenientes de 380 perros, de los cuales 360 correspondían a perros recogidos de colonias y que estaban en custodia en el centro de control canino y felino del municipio de Monterrey, de los cuales se obtuvo una sola garrapata y de los 20 caninos restantes provenientes de clínicas veterinarias, se obtuvieron 2 artrópodos de los cuales se hizo un pool para los estudios posteriores.

Se realizó la identificación de las garrapatas recolectadas en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L. en donde se encontró que de las 400 garrapatas recolectadas, 349 (87.2%) correspondían a *Rhipicephalus sanguineus*, 44 (11%) a *Rhipicephalus boophilus microplus*, 4 (1%) a *Amblyomma* sp y 3 (0.7%) a *Dermacentor* sp.

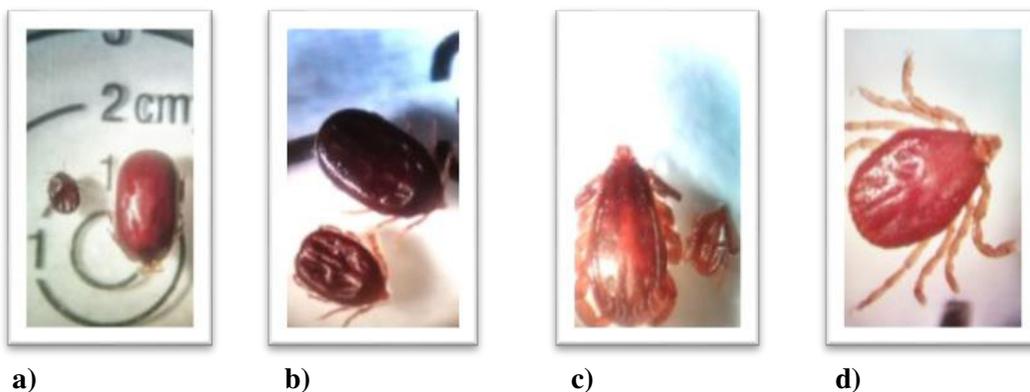


Fig. 3. Ejemplares de garrapatas colectadas en Monterrey, Nuevo León. a) 2 hembras adultas engordadas: izquierda *Rh. boophilus microplus* derecha: *Rh. sanguineus*. b) 2 hembras de *Rh. boophilus microplus* inferior: iniciando estadio de engorda, superior: engordada. c) dos machos: izquierdo: *Rhipicephalus sanguineus*, derecho: *Rh. boophilus microplus* d) macho *Rhipicephalus sanguineus* adulto.

8.2 Determinación de la presencia de *Borrelia burgdorferi*, en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR.

De las 400 muestras analizadas por PCR para *Borrelia*, dos de ellas (0.5%) resultaron positivas a la amplificación del gen: Fla, una muestra fue positiva en una garrapata *Rh. sanguineus* y una segunda muestra fue localizada en un artrópodo del género *Rhipicephalus boophilus microplus* como se muestra en la Fig.4.

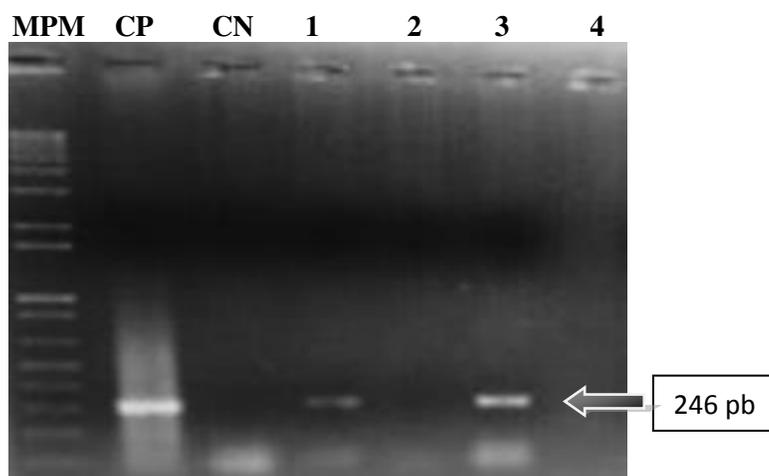


Fig. 4. PCR para amplificación de gen Fla de *Borrelia burgdorferi*. (MPM) marcador de peso molecular 100 pb ladder H3 RTU, (CP) control positivo cepa BbSS ATCC, (CN) control negativo, carril 1, muestra de ADN de *Rh. boophilus microplus*, carril 2 muestra, carril 3 ADN de *Rhipicephalus sanguineus*, carril 4 muestra negativa.

8.3 Determinación de la presencia de *Ehrlichia* spp, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en garrapatas extraídas de perros mediante la técnica de PCR y PCR anidado.

Al analizar el gen 16s ARN para el género *Ehrlichia* spp se pudo demostrar la presencia de 36/400 (9%) garrapatas positivas a este patógeno, donde 32 garrapatas fueron positivas para *Ehrlichia canis* de 32/400 (7.25%) de nuestra muestra total y 7 para *Ehrlichia chaffeensis* (1.75) %, todas estas procedentes de *Rh. sanguineus*.



Fig. 5. PCR para el gen 16S ARN del Genero *Ehrlichia* spp. Gel de agarosa al 1.5 %, M, marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder H3 RTU, CN Control negativo, A-O Muestras de garrapatas, mostrando la amplificación del Gen 16S para *Ehrlichia* spp las muestras de garrapatas 246 (J), 383 (L), 385 (N) de Monterrey, Nuevo León, México, CP Control positivo: cepa de referencia.



Fig. 6. PCR anidado para el género de *Ehrlichia chaffeensis*. Gel de agarosa al 1.5 % donde se analizó la presencia de *Ehrlichia chaffeensis* en garrapatas extraídas de perros por la técnica de PCR anidado, M marcador de peso molecular de 100 bp ADN ladder H3 RTU, CN control negativo, CP control positivo, carriles K, M y P resultados positivos con un peso de 400 pb para las muestras 309, 326 y 339 respectivamente. La muestra del carril O fue reamplificada y resultó positiva para la muestra 331.



Fig. 7. Amplificación por PCR anidado para *Ehrlichia canis*. Gel de Agarosa al 1.5%, M, marcador de peso molecular (100 pb ADN Ladder H3 RTU Nippon Genetics®) carriles, CP control positivo y carril h muestra negativa, CN control negativo, las muestras positivas de un tamaño de 400 pares de bases en los carriles A, B, D, E, F, I. Carriles C, G y H muestras negativas para el análisis de la presencia de *Ehrlichia canis* en garrapatas colectadas de perros mediante la técnica de PCR.

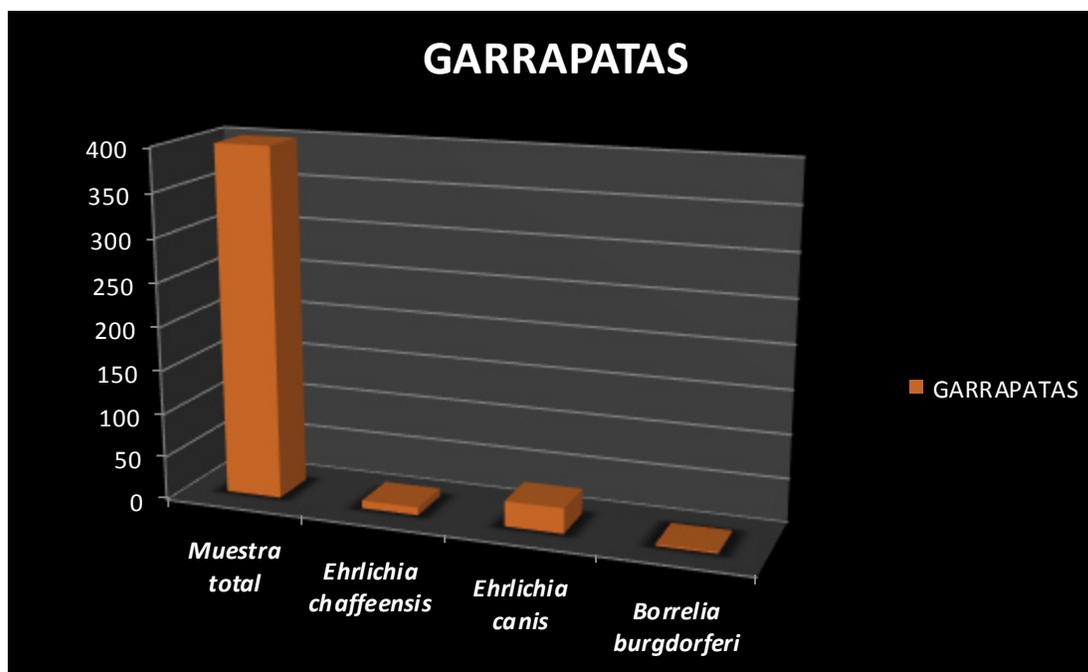
8.4 Ubicación de las colonias y estimación de resultados positivos de acuerdo al sector oriente y poniente de la ciudad.

El municipio de Monterrey tiene aproximadamente 500 colonias, dentro de las cuales nuestro estudio permitió la colecta de 130 colonias dentro de las cuales se analizaron los Ixodidos muestreados y al analizarlos se encontró los datos siguientes:

Colonias analizadas	Ubicación geográfica	Hallazgos de patógenos
70	Oriente	12
57	Poniente	21
3	Centro	3

Tabla 2.- Colonias muestreadas y con presencia de patógenos en oriente y el poniente de la ciudad de Monterrey.

La presencia de estos patógenos se esquematiza a continuación donde fueron positivas a *Ehrlichia canis* 32/400 (8%), *Ehrlichia chaffeensis* 7/400 (1.75%) y *Borrelia burgdorferi* 2/400 (0.5%). Las garrapatas analizadas fueron del género de *Rhipicephalus sanguineus* y *Rh. boophilus sanguineus*, la gráfica a continuación detalla la presencia de los patógenos en estas garrapatas colectadas en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México.



Gráfica 1.- Garrapatas muestreadas, analizadas y especificando el patógeno hallado en ellas.

Muestra	Género-Especie	Estadio	Colonia	Zona	Resultado	Resultado	Resultado	
11	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Mitras centro	Poniente	<i>E. canis</i>			
13	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Mitras centro	Poniente	<i>E. canis</i>			
21	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Condocasa mitras	Poniente	<i>E. canis</i>			
22	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Condocasa mitras	Poniente	<i>E. canis</i>			
23	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Condocasa mitras	Poniente	<i>E. canis</i>			
27	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Residencial Lincoln	Poniente	<i>E. canis</i>			
175	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Caracol	Centro	<i>E. canis</i>			
201	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Acero	Centro	<i>E. canis</i>	<i>B. burgdorferi</i>	<i>E. chaffeensis</i>	

212	Rh. Boophilus microplus	hembra Engordada	Ciudad satélite	Oriente	<i>E. canis</i>			
234	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Pedregal de la silla	Oriente	<i>E. canis</i>			
236	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Barrio Alameda	Poniente	<i>E. canis</i>			
237	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Nuevo Repueblo	Oriente	<i>E. canis</i>			
239	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Brisas	Oriente	<i>E. canis</i>			
242	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	cerro de la campana	Oriente	<i>E. canis</i>			
245	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Terminal	poniente	<i>E. canis</i>			
246	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Zapata	poniente	<i>E. canis</i>			
299	Rh. Boophilus microplus	hembra Engordada	CROC	poniente	<i>E. canis</i>			
308	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Regina	Oriente	<i>E. canis</i>			
309	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Aztlán	poniente			<i>E. chaffeensis</i>	
325	Rh. Boophilus microplus	hembra Engordada	Centro	Centro	<i>E. canis</i>	<i>B. burgdorferi</i>		
326	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Antonio I. Villarreal	poniente			<i>E. chaffeensis</i>	
331	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Antonio I. Villarreal	poniente	<i>E. canis</i>			
339	Rh. Boophilus microplus	hembra Engordada	Mederos	Oriente			<i>E. chaffeensis</i>	
342	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Popular	poniente	<i>E. canis</i>			
345	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Paraíso	Oriente	<i>E. canis</i>			
346	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Genaro Vázquez	poniente	<i>E. canis</i>			
351	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Rubén Jaramillo	poniente	<i>E. canis</i>			
352	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Kennedy	poniente	<i>E. canis</i>		<i>E. chaffeensis</i>	
353	Rhipicephalus sanguineus	macho adulto	Primero de Mayo	poniente			<i>E. chaffeensis</i>	
361	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Primero de Mayo	poniente	<i>E. canis</i>			
362	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Centrika	poniente	<i>E. canis</i>			
383	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Jard. de la Moderna	Oriente	<i>E. canis</i>			
385	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Torremolinos	Oriente	<i>E. canis</i>			
391	Rhipicephalus sanguineus	hembra Engordada	Pablo González	poniente	<i>E. canis</i>			
397	Rh. Boophilus microplus	macho adulto	Balcones del Carmen	Oriente	<i>E. canis</i>		<i>E. chaffeensis</i>	
398	Rhipicephalus sanguineus	macho Adulto	La bola	Oriente	<i>E. canis</i>			
				TOTAL	32	2	7	

Tabla 3.- Localización geográfica de vectores, género de garrapatas positivas y patógenos encontrados, en las colonias de Monterrey, Nuevo León, México.

La siguiente imagen muestra la ubicación de la ubicación en el mapa de Monterrey donde se determinaron los puntos geográficos de las garrapatas halladas en la ciudad que resultaron positivas a los patógenos buscados, (Fig. 8).

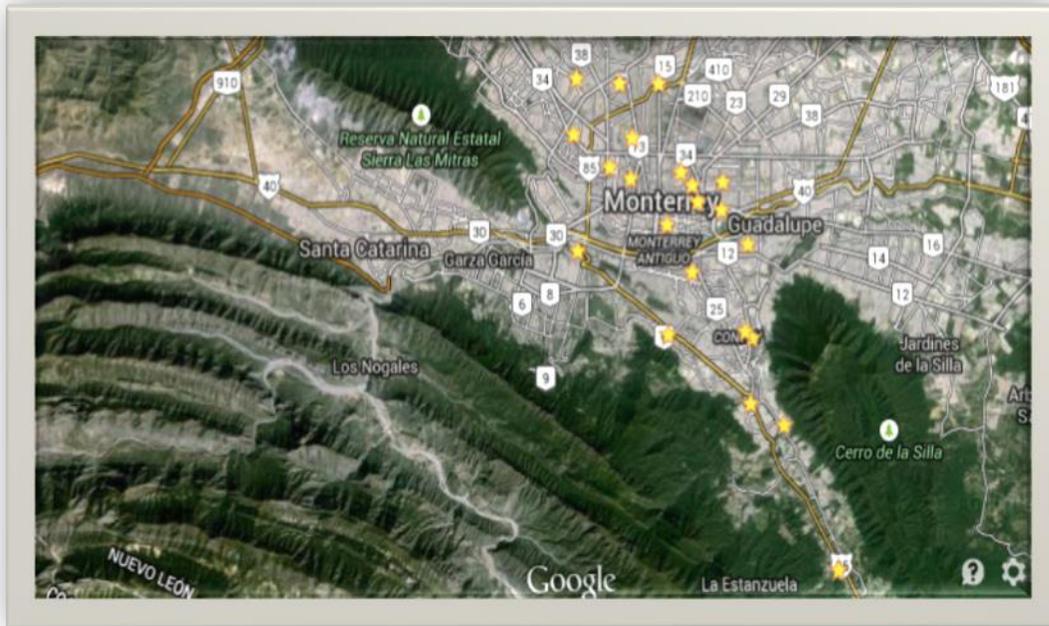


Fig. 8.- Localización de las garrapatas colectadas (estrellas amarillas) y positivas a los patógenos esperados.

8.5 Análisis de Resultados

Dentro de la práctica de la medicina la presencia de enfermedades con cuadros febriles y petequiales en las cuales hay ocasiones donde se puede llegar a un diagnóstico presuntivo erróneo, estos se ha incrementado y su incidencia en México propone alertas que antes no se apreciaban quizás debido a un mal control poblacional de sus transmisores. En algunas zonas del país se han observado casos clínicos producidos por entidades que han provocado la muerte en quien recurren a la consulta externa debido a que no se les ha otorgado un tratamiento oportuno y certero, el efecto de la presencia de perros de vida libre y/o mal atendidos los cuales son probables portadores y juegan el papel de centinela en el transporte de estos patógenos no ha sido del todo estudiado para evitar la continua presencia anual. *Borrelia burgdorferi* es la bacteria causante de la enfermedad de Lyme. *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* son microorganismos que provocan padecimientos hematológicos catalogadas como transmitidas principalmente por artrópodos hematófagos produciendo procesos patológicos de diversos grados en animales y humanos. En el presente estudio que se realizó en el municipio de Monterrey, Nuevo León se recolectaron un total de 400 garrapatas principalmente del género *Rhipicephalus sanguineus* a partir de perros confinados a la secretaría de salubridad municipal y algunas otras muestras que procedían de clínicas veterinaria de esta ciudad donde se tomaron garrapatas a partir de ellos. Estos ectoparásitos se sometieron a un análisis usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa donde se trató de encontrar fragmentos nucleicos específicos de estos microorganismos, encontrando la presencia de ellos en algunos de estos vectores. El presente trabajo trata de establecer la relación entre garrapatas infectadas y la probable incidencia en nuestra localidad. La presencia de vectores cuya positividad fueron para *B. burgdorferi* fue de 1 macho adulto y una hembra adulta engordada del genero *Rh. boophilus microplus*, un hallazgo nuevo para esta especie de garrapata en nuestro estado.

9. DISCUSIÓN

I. Detección molecular de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Las variantes en las técnicas de PCR para determinar la presencia de *Borrelia burgdorferi* B31 que es la cepa base para la gran mayoría de pruebas diagnósticas tanto serológicas como moleculares debido a que ahora hay pruebas específicas para *B. burgdorferi* sensu stricto y sensu lato, Las 19 especies que han sido identificadas como pertenecientes a producir cuadros infecto-contagiosos en el humano y en algunas especies y que todas ellas son transmitidas por garrapatas han provocado controversia en sus diagnósticos por metodologías serológicas ya que se cree que no tienen los mismos epítopes de superficie de membrana como flagelares que las cepas de referencia dando lugar a los falsos positivos. La técnica más efectiva es la hasta ahora es la PCR que determina la presencia de genes que son específicos en la especie *Borrelia burgdorferi* y sus serovariantes y que no se hallan en otra espiroqueta, en el caso nuestro se utilizó la detección del gen Fla, que es uno de los que están siempre presentes en este género.

1. Presencia de *B. burgdorferi* sensu lato en las garrapatas.

Desde que iniciaron los estudios donde se buscaba determinar la presencia de la enfermedad de Lyme en nuestro país, no se ha detallado el dato exacto de la prevalencia y la incidencia de la infección por *Borrelia burgdorferi*, algunos estudios han encontrado que algunas especies son más propensas que otras, más sin embargo las estadísticas de sus epidemiología hasta hoy en día no son exactas. En el presente estudio encontramos valores donde para la amplificación de los fragmentos de *B. burgdorferi* se utilizaron los oligonucleótidos BBSL1 y BBSL3 los cuales amplifican una región de 800 pb, (Gordillo-Perez, et al., 2009) . La presencia del fragmento nucleico de *Ehrlichia canis* se amplifica con los primers 15 F y 842 R.

2. Número y especie de las garrapatas infectadas por *Borrelia burgdorferi*.

Nuestro estudio determinó que las garrapatas de los géneros *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus boophilus microplus*, donde se encontró ADN de *B. burgdorferi* en un ejemplar de cada uno de ellas, (Andreotti, et al., 2011).

Dentro de las muestras recolectadas y analizadas de la ciudad de Monterrey la presencia de la *Borrelia* de Lyme se encontró presente en 2 garrapatas fueron positivas para este patógeno, las dos especies fueron pertenecientes al género *Rhipicephalus*, siendo un ejemplar de *Rh. boophilus microplus* cuyo estadio fue que su sexo era hembra y engordada y un ejemplar *Rh. sanguineus* macho adulto. Siendo demostrada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en dos especies diferentes de artrópodos de la familia *Ixodidae* en la ciudad de Monterrey.

3. Grado de alimentación de los ejemplares infectados por *B. burgdorferi*.

La presencia de *Borrelia burgdorferi* en hembras engordadas de *Rh. boophilus microplus* y un macho adulto *Rh. sanguineus* demuestran que entre más tiempo este un vector adherido al hospedero mayor será la probabilidad de ser infectado, ya que el tiempo determina la posible migración de la bacteria hacia la garrapata que ya se encuentra adherida al hospedero, (Andreotti, et al., 2011).

4. Distribución de las garrapatas infectadas por *B. burgdorferi*.

En la apreciación que hayamos con referencia a la presencia del agente de Lyme en el municipio de Monterrey, encontramos que las garrapatas procedentes de perros recolectadas y analizadas se encontraban en la zona centro de esta ciudad y con una distancia no mayor a 3 kilómetros entre una colonia y otra, (Hou, et al., 2015).

5. Número de garrapatas infectadas por mes, según su variación estacional.

La recolecta de garrapatas se inició en el año de 2013, en el mes de abril, marcando tendencia mayor en los meses de más calor dentro del periodo de primavera-verano, principalmente desde mayo a septiembre, la gran mayoría de nuestro ejemplares fueron recolectados en el periodo de abril del 2013 a noviembre del 2014 encontrando tendencias de los principales géneros que circulan en nuestra ciudad *Rh. boophilus microplus* y *Rh. sanguineus*, (Turtinen, Kruger, & Hacker, 2015).

II. Detección molecular de *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis es un patógeno que provoca una zoonosis de importancia mundial y epidemiológica por su ciclo de transmisión, donde *Rhipicephalus sanguineus* es su vector primario y que tiene presencia en todo nuestro territorio. El proceso para determinar su incidencia y frecuencia debería de ser anualmente monitoreada ya que al regirse por dos ciclos y al tener capacidad de permanecer todo el año en reproducción da lugar a posibles brotes aislados incluso en épocas donde no debería estar presente el vector como lo es en invierno. Los resultados arrojaron que la positividad fue en 17 hembras adultas engordadas y en 15 machos adultos lo cual nos demuestra que esta bacteria al presentar el ciclo de vida que le permite estar presente desde la eclosión a larva no es un factor determinante el sexo de su futuro vector, (Rufino, et al., 2013).

III. Detección molecular de *Ehrlichia chaffeensis*

1. Prevalencia y distribución de *E. chaffeensis* en las garrapatas.

La presencia de *E. chaffeensis* en nuestros especímenes recolectados fueron en garrapatas del genero *Rhipicephalus sanguineus* de etapa adulta ya que la presencia de fases larvarias no se halló, en esta colecta, dato importante que queda para desarrollar un proceso de búsqueda y determinar si las fases

inmaduras pueden llegar a presentar ya en su sistema digestivo a este microorganismo. Los análisis a los vectores mostraron que la presencia de este patógeno es más frecuente en hembras adultas engordadas, hallándolo en 5 muestras, sin embargo el hallazgo de este microorganismo en machos adultos donde se le encontró en 2 ejemplares propicia a demostrar que quizás sea transmitido hacia el vector con la misma facilidad en ambos sexos, (Felek, Unver, Stich, & Rikihisa, 2001).

2. Distribución temporal de la infección por *E. chaffeensis*.

La época de colección de garrapatas que presentaban este género de bacteria fue de los meses de Agosto y Septiembre, (Beall, et al., 2012).

10. CONCLUSIONES

1.- El presente estudio nos refleja la presencia de distintos patógenos en garrapatas del género *Rhipicephalus* spp. dándonos una idea de la problemática de la Erliquiosis Monocítica Canina, Erliquiosis Granulocítica Humana y la Enfermedad de Lyme que tenemos en nuestra comunidad y que han alcanzado estos rangos de distribución debido a que no se le ha prestado la importancia a la presencia y diseminación de su vector, inclusive a malos manejos de los tratamientos preventivos para evitar la proliferación de los vectores, el tiempo indicado para el tratamiento de la erliquiosis en perros que cuando no es el adecuado provoca frecuentemente la famosa resistencia de las garrapatas, dando lugar a las facilidades para su sobrevivencia e incluso provocando la aparición de nuevas especies de *Ehrlichia* spp y variantes genéticas nuevas de *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Estudios patológicos y moleculares han indicado que estos patógenos se han adaptado a nuevos sistemas y órganos del cuerpo de perros infectados, apareciendo y provocando nuevos signos y síntomas. Los médicos veterinarios deben de estar conscientes de que las enfermedades transmitidas por garrapatas son padecimientos emergentes de los cuales pueden convertirse en zoonosis en el propio dueño del paciente canino.

2.- La bacteria *Ehrlichia chaffeensis* no se hallaba reportada en nuestro estado, los datos epidemiológicos están recientemente abiertos para sus estudio, con la idea de encontrar nuevas alternativas diagnosticas para esta especie que hasta ahora no se conocía su estadía en Nuevo León.

3.- El reporte de la presencia de coinfecciones en garrapatas del genero *Rhipicephalus sanguineus* no era conocido ya que se cuentan con pocos datos epidemiológicos referente a estas bacteria y su coexistencia en garrapatas de este género y especie en México.

4.- La presencia de *Borrelia burgdorferi* en garrapatas del género *Rhipicephalus* spp y demostrar que es un vector competente para transmitir la Enfermedad de Lyme es de suma importancia debido al grado de complejidad de este padecimiento, este es el primer reporte de *B. burgdorferi* en *Rh. sanguineus* en la ciudad de Monterrey.

5.- Queda establecido que *Rhipicephalus boophilus microplus* es una garrapata que puede albergar en su interior patógenos diversos como es el caso *Borrelia burgdorferi* de la cual no se tenía reporte de su presencia en México en esta especie de artrópodo, colocándola como un vector capaz de retener a este patógeno en su interior por periodos que pueden resultar prósperos para diseminar la infección de la borreliosis de Lyme en nuestra localidad.

6.- La capacidad de ofrecer las condiciones necesarias para que las bacterias coexistan en el interior de *Rh. sanguineus* quedo establecido al determinar en un ejemplar los tres patógenos buscados en un macho adulto y para *Rh. boophilus microplus* el hallar coinfección de *B. burgdorferi* y *E. canis* son hallazgos no esperado para estos Ixodidos, lo que permite afirmar que el género *Rhipicephalus* spp es un vector competente para estos patógenos.

7. En el municipio de Monterrey Nuevo León, México existen las condiciones climatológicas y la presencia de los vectores que en este trabajo comprobamos que son competentes para la diseminación de estos patógenos, cabe mencionar que los estudios epidemiológicos por parte de las autoridades sanitarias para determinar si existen casos reportados en pacientes humanos es de alta prioridad para comenzar con campañas de concientización por parte de dueños de mascotas y de personal de la salud y queden por enterados de estas zoonosis ya presentes en nuestra región.

11. BIBLIOGRAFIA

- Adaszek, L., Dziegiel, B., Krzysiak, M., Skrzypczak, M., Adaszek, M., Staniec, M., et al. (2014). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in the blood of wild bison from Bialowieza primeval forest in eastern Poland. *Pol J Vet Sci*, 17(4), 713-715.
- Adeolu, M., & Gupta, R. S. (2014). A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105(6), 1049-1072.
- Alves, R. N., Levenhagen, M. A., Levenhagen, M. M., Rieck, S. E., Labruna, M. B., & Beletti, M. E. (2014). The spreading process of *Ehrlichia canis* in macrophages is dependent on actin cytoskeleton, calcium and iron influx and lysosomal evasion. *Vet Microbiol*, 168(2-4), 442-446.
- Amyx, H. L., & Huxsoll, D. L. (1973). Red and gray foxes--potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. *J Wildl Dis*, 9(1), 47-50.
- Anderson, B. E., Dawson, J. E., Jones, D. C., & Wilson, K. H. (1991). *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol*, 29(12), 2838-2842.
- Anderson, J. F., Duray, P. H., & Magnarelli, L. A. (1990). *Borrelia burgdorferi* and *Ixodes dammini* prevalent in the greater Philadelphia area. *J Infect Dis*, 161(4), 811-812.
- Anderson, J. F., Johnson, R. C., Magnarelli, L. A., & Hyde, F. W. (1986). Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 51(2), 394-396.
- Andiman, W. A. (1986). Lyme disease: epidemiology, etiology, clinical spectrum, diagnosis, and treatment. *Adv Pediatr Infect Dis*, 1, 163-186.
- Andrade, G. B., Barreto, W. T., Santos, L. L., Ribeiro, L. R., Macedo, G. C., Sousa, K. C., et al. (2014). Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 23(4), 509-515.
- Andreotti, R., Perez de Leon, A. A., Dowd, S. E., Guerrero, F. D., Bendele, K. G., & Scoles, G. A. (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol*, 11(1), 6.
- Anguita, J., Hedrick, M. N., & Fikrig, E. (2003). Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol Rev*, 27(4), 493-504.
- Arroyave, R.-G. C. M. (1994). *Enfermedad de Lyme* Mexico, Distrito Federal: Centro diagnostico en inmunología y alergias y Unidad de laboratorios de ingeniería y expresión genética, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Badalian, L. O., Kravchuk, L. N., Sergovskaia, V. D., Belousova, V. S., & Minina, A. P. (1994). [The neurological syndromes in Lyme disease in children]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 94(3), 3-6.
- Baneth, G., Harrus, S., Gal, A., & Aroch, I. (2015). Canine vector-borne co-infections: *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in the same host monocytes. *Vet Parasitol*, 208(1-2), 30-34.
- Baril, C., Richaud, C., Baranton, G., & Saint Girons, I. S. (1989). Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol*, 140(8), 507-516.
- Beall, M. J., Alleman, A. R., Breitschwerdt, E. B., Cohn, L. A., Couto, C. G., Dryden, M. W., et al. (2012). Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit Vectors*, 5, 29.

- Beraki, E., Olsen, T. K., & Sauer, T. (2012). Establishing a protocol for immunocytochemical staining and chromogenic in situ hybridization of Giemsa and Diff-Quick prestained cytological smears. *Cytojournal*, 9, 8.
- Berger, B. W., Johnson, R. C., Kodner, C., & Coleman, L. (1992). Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol*, 30(2), 359-361.
- Billings, A. N., Rawlings, J. A., & Walker, D. H. (1998). Tick-borne diseases in Texas: a 10-year retrospective examination of cases. *Tex Med*, 94(12), 66-76.
- Block, S. L. (2013). "Making lemonade" out of lyme. *Pediatr Ann*, 42(2), 57-60.
- Bonfanti, U., Zini, E., Minetti, E., & Zatelli, A. (2004). Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Lleishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Bbabsesia canis*. *J Vet Intern Med*, 18(5), 618-624.
- Braga, I. A., dos Santos, L. G., de Souza Ramos, D. G., Melo, A. L., da Cruz Mestre, G. L., & de Aguiar, D. M. (2014). Detection of *Ehrlichia canis* in domestic cats in the central-western region of Brazil. *Braz J Microbiol*, 45(2), 641-645.
- Braga, I. A., dos Santos, L. G., Melo, A. L., Jaune, F. W., Ziliani, T. F., Girardi, A. F., et al. (2013). Hematological values associated to the serological and molecular diagnostic in cats suspected of *Ehrlichia canis* infection. *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(4), 470-474.
- Breitschwerdt, E. B., Abrams-Ogg, A. C., Lappin, M. R., Bienzle, D., Hancock, S. I., Cowan, S. M., et al. (2002). Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *J Vet Intern Med*, 16(6), 642-649.
- Bremell, D., & Hagberg, L. (2011). Clinical characteristics and cerebrospinal fluid parameters in patients with peripheral facial palsy caused by Lyme neuroborreliosis compared with facial palsy of unknown origin (Bell's palsy). *BMC Infect Dis*, 11, 215.
- Bremer, W. G., Schaefer, J. J., Wagner, E. R., Ewing, S. A., Rikihisa, Y., Needham, G. R., et al. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol*, 131(1-2), 95-105.
- Brorson, O., & Brorson, S. H. (1998). A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *APMIS*, 106(12), 1131-1141.
- Bruder, K. (1950). [Lipschutz's erythema chronicum migrans]. *Dermatol Wochenschr*, 121(15), 337-344.
- Buker, M., Picozzi, K., Kolb, S., & Hatt, J. M. (2013). First detection of *Borrelia burgdorferi*-antibodies in free-living birds of prey from Eastern Westphalia, Germany. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 155(7), 411-416.
- Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., & Davis, J. P. (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216(4552), 1317-1319.
- Burgess, B. (1988). British Columbia. Lyme Disease in horses. *Can Vet J*, 29(4), 393-394.
- Cao, W. C., Gao, Y. M., Zhang, P. H., Zhang, X. T., Dai, Q. H., Dumler, J. S., et al. (2000). Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from Southern China. *J Clin Microbiol*, 38(7), 2778-2780.
- Carey, A. B., Krinsky, W. L., & Main, A. J. (1980). *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) and associated ixodid ticks in South-central Connecticut, USA. *J Med Entomol*, 17(1), 89-99.
- Carlos M. Arroyave, R. T.-G. (1994). Enfermedad de Lyme. Informa de dos casos. *Boletín Médico del Hospital infantil de México*, 51(First reports of Lyme Disease in México), 117-121.
- Carter, N., & Miller, N. R. (1997). Fourth nerve palsy caused by *Ehrlichia chaffeensis*. *J Neuroophthalmol*, 17(1), 47-50.

- Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Carlos, R. S., & Albuquerque, G. R. (2008). Epidemiological and molecular study of Ehrlichia canis in dogs in Bahia, Brazil. *Genet Mol Res*, 7(3), 657-662.
- Casjens, S. R., Fraser-Liggett, C. M., Mongodin, E. F., Qiu, W. G., Dunn, J. J., Luft, B. J., et al. (2011). Whole genome sequence of an unusual Borrelia burgdorferi sensu lato isolate. *J Bacteriol*, 193(6), 1489-1490.
- Cicuttin, G. L., Tarragona, E. L., De Salvo, M. N., Mangold, A. J., & Nava, S. (2015). Infection with Ehrlichia canis and Anaplasma platys (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick Borne Dis*.
- Clark, K. L., Oliver, J. H., Jr., James, A. M., Durden, L. A., & Banks, C. W. (2002). Prevalence of borrelia burgdorferi sensu lato infection among rodents and host-seeking ticks in South Carolina. *J Med Entomol*, 39(1), 198-206.
- Clark, R. P., & Hu, L. T. (2008). Prevention of lyme disease and other tick-borne infections. *Infect Dis Clin North Am*, 22(3), 381-396, vii.
- Cochez, C., Heyman, P., Heylen, D., Fonville, M., Hengeveld, P., Takken, W., et al. (2015). The Presence of Borrelia miyamotoi, A Relapsing Fever Spirochaete, in Questing Ixodes ricinus in Belgium and in The Netherlands. *Zoonoses Public Health*, 62(5), 331-333.
- Codner, E. C., & Maslin, W. R. (1992). Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. *Am J Vet Res*, 53(3), 294-299.
- Comer, J. A., Nicholson, W. L., Paddock, C. D., Sumner, J. W., & Childs, J. E. (2000). Detection of antibodies reactive with Ehrlichia chaffeensis in the raccoon. *J Wildl Dis*, 36(4), 705-712.
- Connally, N. P., Durante, A. J., Yousey-Hindes, K. M., Meek, J. I., Nelson, R. S., & Heimer, R. (2009). Peridomestic Lyme disease prevention: results of a population-based case-control study. *Am J Prev Med*, 37(3), 201-206.
- Conrad, M. E. (1989). Ehrlichia canis: a tick-borne rickettsial-like infection in humans living in the southeastern United States. *Am J Med Sci*, 297(1), 35-37.
- Crocquet-Valdes, P. A., Thirumalapura, N. R., Ismail, N., Yu, X., Saito, T. B., Stevenson, H. L., et al. (2011). Immunization with Ehrlichia P28 outer membrane proteins confers protection in a mouse model of ehrlichiosis. *Clin Vaccine Immunol*, 18(12), 2018-2025.
- Chao, L. L., Liu, L. L., Ho, T. Y., & Shih, C. M. (2014). First detection and molecular identification of Borrelia garinii spirochete from Ixodes ovatus tick ectoparasitized on stray cat in Taiwan. *PLoS One*, 9(10), e110599.
- Cheng, C., & Ganta, R. R. (2008). Laboratory maintenance of Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia canis and recovery of organisms for molecular biology and proteomics studies. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 3, Unit 3A 1.
- Danielova, V., Daniel, M., Rudenko, N., & Golovchenko, M. (2004). Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies in host-seeking Ixodes ricinus ticks in selected South Bohemian locations (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health*, 12(3), 151-156.
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. *Parasit Vectors*, 3, 26.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L. A., & Brandao-Filho, S. P. (2006). Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39(1), 64-67.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L. A., & Otranto, D. (2011). Seasonal variation in the effect of climate on the biology of Rhipicephalus sanguineus in southern Europe. *Parasitology*, 138(4), 527-536.

- Davidson, B. E., MacDougall, J., & Saint Girons, I. (1992). Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. *J Bacteriol*, *174*(11), 3766-3774.
- Davidson, W. R., Lockhart, J. M., Stallknecht, D. E., Howerth, E. W., Dawson, J. E., & Rechav, Y. (2001). Persistent Ehrlichia chaffeensis infection in white-tailed deer. *J Wildl Dis*, *37*(3), 538-546.
- de Oliveira, L. S., Mourao, L. C., Oliveira, K. A., da Matta Agostini, M., de Oliveira, A. C., de Almeida, M. R., et al. (2009). Molecular detection of Ehrlichia canis in cats in Brazil. *Clin Microbiol Infect*, *15 Suppl 2*, 53-54.
- Derdakova, M., & Lencakova, D. (2005). Association of genetic variability within the Borrelia burgdorferi sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med*, *12*(2), 165-172.
- Donahue, J. G., Piesman, J., & Spielman, A. (1987). Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am J Trop Med Hyg*, *36*(1), 92-96.
- Donatien, A., Lestoquard, F., & et al. (1947). [Not Available]. *Arch Inst Pasteur Alger*, *25*(1), 62-70.
- Duneau, D., Bouludier, T., Gomez-Diaz, E., Petersen, A., Tveraa, T., Barrett, R. T., et al. (2008). Prevalence and diversity of Lyme borreliosis bacteria in marine birds. *Infect Genet Evol*, *8*(3), 352-359.
- Dunn, B. E., Monson, T. P., Dumler, J. S., Morris, C. C., Westbrook, A. B., Duncan, J. L., et al. (1992). Identification of Ehrlichia chaffeensis morulae in cerebrospinal fluid mononuclear cells. *J Clin Microbiol*, *30*(8), 2207-2210.
- Ebani, V. V., & Bertelloni, F. (2014). Serological evidence of exposure to Ehrlichia canis and Anaplasma phagocytophilum in Central Italian healthy domestic cats. *Ticks Tick Borne Dis*, *5*(6), 668-671.
- Eddlestone, S. M., Diniz, P. P., Neer, T. M., Gaunt, S. D., Corstvet, R., Cho, D., et al. (2007). Doxycycline clearance of experimentally induced chronic Ehrlichia canis infection in dogs. *J Vet Intern Med*, *21*(6), 1237-1242.
- Eskow, E., Rao, R. V., & Mordechai, E. (2001). Concurrent infection of the central nervous system by Borrelia burgdorferi and Bartonella henselae: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch Neurol*, *58*(9), 1357-1363.
- Esteve-Gassent, M. D., Grover, A., Feria-Arroyo, T. P., Castro-Arellano, I., Medina, R. F., Gordillo-Perez, G., et al. (2015). Prevalence of Borrelia burgdorferi-infected ticks from wildlife hosts, a response to Norris et al. *Parasit Vectors*, *8*, 129.
- Ewing, S. A., Dawson, J. E., Panciera, R. J., Mathew, J. S., Pratt, K. W., Katavolos, P., et al. (1997). Dogs infected with a human granulocytotropic Ehrlichia spp. (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J Med Entomol*, *34*(6), 710-718.
- Faria, J. L., Dagnone, A. S., Munhoz, T. D., Joao, C. F., Pereira, W. A., Machado, R. Z., et al. (2010). Ehrlichia canis morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. *Rev Bras Parasitol Vet*, *19*(2), 98-102.
- Felek, S., Unver, A., Stich, R. W., & Rikihisa, Y. (2001). Sensitive detection of Ehrlichia chaffeensis in cell culture, blood, and tick specimens by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, *39*(2), 460-463.
- Feria-Arroyo, T. P., Castro-Arellano, I., Gordillo-Perez, G., Cavazos, A. L., Vargas-Sandoval, M., Grover, A., et al. (2014). Implications of climate change on the distribution of the tick vector Ixodes scapularis and risk for Lyme disease in the Texas-Mexico transboundary region. *Parasit Vectors*, *7*, 199.

- Ferreira, R. F., Cerqueira Ade, M., Castro, T. X., Ferreira Ede, O., Neves, F. P., Barbosa, A. V., et al. (2014). Genetic diversity of Ehrlichia canis strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 23(3), 301-308.
- Foley, J., Ott-Conn, C., Worth, J., Poulsen, A., & Clifford, D. (2014). An Ixodes minor and Borrelia carolinensis enzootic cycle involving a critically endangered Mojave Desert rodent. *Ecol Evol*, 4(5), 576-581.
- Fourie, J. J., Stanneck, D., Luus, H. G., Beugnet, F., Wijnveld, M., & Jongejan, F. (2013). Transmission of Ehrlichia canis by Rhipicephalus sanguineus ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol*, 197(3-4), 595-603.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., et al. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi. *Nature*, 390(6660), 580-586.
- Fukunaga, M., & Sohnaka, M. (1992). Tandem repeat of the 23S and 5S ribosomal RNA genes in Borrelia burgdorferi, the etiological agent of Lyme disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 183(3), 952-957.
- Gal, A., Harrus, S., Arcoh, I., Lavy, E., Aizenberg, I., Mekuzas-Yisaschar, Y., et al. (2007). Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Can Vet J*, 48(6), 619-622.
- Gal, A., Loeb, E., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2008). Detection of Ehrlichia canis by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet J*, 175(2), 212-217.
- Galaviz-Silva, L., Perez-Trevino, K. C., & Molina-Garza, Z. J. (2013). Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo Leon, Mexico, and their association with Borrelia burgdorferi sensu lato. *Exp Appl Acarol*, 61(4), 491-501.
- Girard, Y. A., Fedorova, N., & Lane, R. S. (2011). Genetic diversity of Borrelia burgdorferi and detection of B. bissettii-like DNA in serum of north-coastal California residents. *J Clin Microbiol*, 49(3), 945-954.
- Gongora-Biachi, R. A., Zavala-Velazquez, J., Castro-Sansores, C. J., & Gonzalez-Martinez, P. (1999). First case of human ehrlichiosis in Mexico. *Emerg Infect Dis*, 5(3), 481.
- Gongora-Bianchi R.A., Z.-V. J., Castro- Sansores C.J., Gonzalez-Martinez P. (1999). First case of human ehrlichiosis in Mexico. *Journal ListEmerg Infect Dis*, 5(3), 481.
- Gonzalez, A., Castro Ddel, C., & Gonzalez, S. (2004). Ectoparasitic species from Canis familiaris (Linne) in Buenos Aires province, Argentina. *Vet Parasitol*, 120(1-2), 123-129.
- Gordillo-Perez, G., Torres, J., Solorzano-Santos, F., de Martino, S., Lipsker, D., Velazquez, E., et al. (2007). Borrelia burgdorferi infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. *Emerg Infect Dis*, 13(10), 1556-1558.
- Gordillo-Perez, G., Torres, J., Solorzano-Santos, F., Garduno-Bautista, V., Tapia-Conyer, R., & Munoz, O. (2003). [Seroepidemiologic study of Lyme's borreliosis in Mexico City and the northeast of the Mexican Republic]. *Salud Publica Mex*, 45(5), 351-355.
- Gordillo-Perez, G., Vargas, M., Solorzano-Santos, F., Rivera, A., Polaco, O. J., Alvarado, L., et al. (2009). Demonstration of Borrelia burgdorferi sensu stricto infection in ticks from the northeast of Mexico. *Clin Microbiol Infect*, 15(5), 496-498.
- Gordillo, G., Torres, J., Solorzano, F., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R., & Munoz, O. (1999). Serologic evidences suggesting the presence of Borrelia burgdorferi infection in Mexico. *Arch Med Res*, 30(1), 64-68.
- Grant, A. C., Hunter, S., & Partin, W. C. (1997). A case of acute monocytic ehrlichiosis with prominent neurologic signs. *Neurology*, 48(6), 1619-1623.

- Grimm, D., Tilly, K., Bueschel, D. M., Fisher, M. A., Policastro, P. F., Gherardini, F. C., et al. (2005). Defining plasmids required by *Borrelia burgdorferi* for colonization of tick vector *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 42(4), 676-684.
- Guadalupe Gordillo-Pérez, J. T., * Fortino Solórzano-Santos,* Sylvie de Martino, Dan Lipsker,† Edmundo Velázquez,* & Guillermo Ramon, M. O., * and Benoit Jaulhac. (2007). *Borrelia burgdorferi* Infection and Cutaneous Lyme Disease, Mexico. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • No. 10, , Vol. 13, 1556-1558.
- Hamer, S. A., Hickling, G. J., Walker, E. D., & Tsao, J. I. (2014). Increased diversity of zoonotic pathogens and *Borrelia burgdorferi* strains in established versus incipient *Ixodes scapularis* populations across the Midwestern United States. *Infect Genet Evol*, 27, 531-542.
- Harrus, S. (2015). Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet J*, 204(3), 239-240.
- Harrus, S., Day, M. J., Waner, T., & Bark, H. (2001). Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol*, 83(4), 343-349.
- Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I., & Waner, T. (1998). Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol*, 78(2), 155-160.
- Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K. Y., Morick, D., Eyal, O., & Baneth, G. (2011). Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin Microbiol Infect*, 17(3), 459-463.
- Harrus, S., & Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J*, 187(3), 292-296.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J. E., Poland, A. M., & Bark, H. (1998). Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*, 36(1), 73-76.
- Harrus, S., Waner, T., Friedmann-Morvinski, D., Fishman, Z., Bark, H., & Harmelin, A. (2003). Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol*, 96(3-4), 239-243.
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S. O., Hassler, D., & Kimmig, P. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37, 86-92.
- Heo, E. J., Park, J. H., Koo, J. R., Park, M. S., Park, M. Y., Dumler, J. S., et al. (2002). Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. *J Clin Microbiol*, 40(8), 3082-3085.
- Herman-Giddens, M. E. (2014). Tick-borne diseases in the South-East need human studies: Lyme disease, STARI and beyond. *Zoonoses Public Health*, 61(1), 1-3.
- Hildebrandt, P. K., Conroy, J. D., McKee, A. E., Nyindo, M. B., & Huxsoll, D. L. (1973). Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect Immun*, 7(2), 265-271.
- Hiraoka, H., Shimada, Y., Sakata, Y., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., et al. (2007). Detection of *Borrelia garinii*, *Borrelia tanukii* and *Borrelia* sp. closely related to *Borrelia valaisiana* in *Ixodes* ticks removed from dogs and cats in Japan. *Vet Parasitol*, 144(1-2), 188-192.
- Hoskins, J. D., Barta, O., & Rothschmitt, J. (1983). Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 183(9), 1011-1012, 1964.
- Hou, J., Ling, F., Chai, C., Lu, Y., Yu, X., Lin, J., et al. (2015). Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks from eastern China. *Am J Trop Med Hyg*, 92(2), 262-266.

- Hovmark, A., Asbrink, E., Schwan, O., Hederstedt, B., & Christensson, D. (1986). Antibodies to *Borrelia* spirochetes in sera from Swedish cattle and sheep. *Acta Vet Scand*, 27(4), 479-485.
- Illoldi-Rangel, P., Rivaldi, C. L., Sissel, B., Trout Fryxell, R., Gordillo-Perez, G., Rodriguez-Moreno, A., et al. (2012). Species distribution models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme disease in Mexico. *J Trop Med*, 2012, 959101.
- Inokuma, H., Fujii, K., Matsumoto, K., Okuda, M., Nakagome, K., Kosugi, R., et al. (2002). Demonstration of *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet Parasitol*, 110(1-2), 145-152.
- Isogai, E., Isogai, H., Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Kimura, K., et al. (1994). Lyme disease spirochetes in a wild fox (*Vulpes vulpes schrencki*) and in ticks. *J Wildl Dis*, 30(3), 439-444.
- Ivanova, L. B., Tomova, A., Gonzalez-Acuna, D., Murua, R., Moreno, C. X., Hernandez, C., et al. (2014). *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol*, 16(4), 1069-1080.
- Jin, C., Roen, D. R., Lehmann, P. V., & Kellermann, G. H. (2013). An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells*, 2(3), 607-620.
- Johnson, D. K., Schiffman, E. K., Davis, J. P., Neitzel, D. F., Sloan, L. M., Nicholson, W. L., et al. (2015). Human Infection with *Ehrlichia muris*-like Pathogen, United States, 2007-2013(1). *Emerg Infect Dis*, 21(10), 1794-1799.
- Johnson, E. M., Ewing, S. A., Barker, R. W., Fox, J. C., Crow, D. W., & Kocan, K. M. (1998). Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*, 74(2-4), 277-288.
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, S3-14.
- Juricova, Z., & Hubalek, Z. (2009). Serologic survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(5), 479-482.
- Kallick, C. A. (2011). *Ehrlichia* and bone marrow cells: could Ehrlichial infection explain the unsuspected etiology of some diseases of the immune system? *Med Hypotheses*, 77(3), 374-379.
- Kaneda, K., Masuzawa, T., Simon, M. M., Isogai, E., Isogai, H., Yasugami, K., et al. (1998). Infectivity and arthritis induction of *Borrelia japonica* on SCID mice and immune competent mice: possible role of galactosylceramide binding activity on initiation of infection. *Microbiol Immunol*, 42(3), 171-175.
- Kazmierczak, J. J., Amundson, T. E., & Burgess, E. C. (1988). Borreliosis in free-ranging black bears from Wisconsin. *J Wildl Dis*, 24(2), 366-368.
- Kean, W. F., Tocchio, S., Kean, M., & Rainsford, K. D. (2013). The musculoskeletal abnormalities of the Similaun Iceman ("OTZI"): clues to chronic pain and possible treatments. *Inflammopharmacology*, 21(1), 11-20.
- Killmaster, L. F., Loftis, A. D., Zemtsova, G. E., & Levin, M. L. (2014). Detection of bacterial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Georgia, USA, and the use of a multiplex assay to differentiate *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii*. *J Med Entomol*, 51(4), 868-872.
- Kocan, A. A., Levesque, G. C., Whitworth, L. C., Murphy, G. L., Ewing, S. A., & Barker, R. W. (2000). Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in coyotes from Oklahoma. *Emerg Infect Dis*, 6(5), 477-480.

- Kommenou, A. A., Mylonakis, M. E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., et al. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Vet Ophthalmol*, *10*(3), 137-142.
- Kongklieng, A., Thanchomnang, T., Intapan, P. M., Boonmars, T., Janwan, P., Sanpool, O., et al. (2014). Detection of *Ehrlichia canis* in canine blood samples by real-time fluorescence resonance energy transfer (FRET) PCR and melting curve analysis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, *45*(5), 1149-1156.
- Kosik-Bogacka, D., Bukowska, K., & Kuzna-Grygiel, W. (2002). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mosquitoes (Culicidae) in recreational areas of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med*, *9*(1), 55-57.
- Kosik-Bogacka, D. I., Kuzna-Grygiel, W., & Gornik, K. (2006). *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in mosquitoes from Szczecin area. *Folia Biol (Krakow)*, *54*(1-2), 55-59.
- Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R., & Weigl, E. (2007). Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *151*(2), 175-186.
- Kurilshikov, A. M., Fomenko, N. V., Stronin, O. V., Tikunov, A. Y., Kabilov, M. R., Tupikin, A. E., et al. (2014). Complete Genome Sequencing of *Borrelia valaisiana* and *Borrelia afzelii* Isolated from *Ixodes persulcatus* Ticks in Western Siberia. *Genome Announc*, *2*(6).
- Lane, R. S., Kucera, T. F., Barrett, R. H., Mun, J., Wu, C., & Smith, V. S. (2006). Wild turkey (*Meleagris gallopavo*) as a host of ixodid ticks, lice, and Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) in California state parks. *J Wildl Dis*, *42*(4), 759-771.
- Lane, R. S., Mun, J., Eisen, R. J., & Eisen, L. (2005). Western gray squirrel (Rodentia: Sciuridae): a primary reservoir host of *Borrelia burgdorferi* in Californian oak woodlands? *J Med Entomol*, *42*(3), 388-396.
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A., & Otranto, D. (2014). Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, *5*(6), 943-946.
- Leczinsky, C. G. (1951). Case of erythema chronicum migrans with meningitis. *Acta Derm Venereol*, *31*(4), 464-467.
- Leiva, M., Naranjo, C., & Pena, M. T. (2005). Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. *Vet Ophthalmol*, *8*(6), 387-393.
- Levy, S. A., & Duray, P. H. (1988). Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. *J Vet Intern Med*, *2*(3), 138-144.
- Lindsay, L. R., Barker, I. K., Surgeoner, G. A., McEwen, S. A., Elliott, L. A., & Kolar, J. (1991). Apparent incompetence of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and fleas (Insecta: Siphonaptera) as vectors of *Borrelia burgdorferi* in an *Ixodes dammini* endemic area of Ontario, Canada. *J Med Entomol*, *28*(5), 750-753.
- Lischer, C. J., Leutenegger, C. M., Braun, U., & Lutz, H. (2000). Diagnosis of Lyme disease in two cows by the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA. *Vet Rec*, *146*(17), 497-499.
- Lohmeyer, K. H., Pound, J. M., May, M. A., Kammlah, D. M., & Davey, R. B. (2011). Distribution of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* (Acari: Ixodidae) infestations detected in the United States along the Texas/Mexico border. *J Med Entomol*, *48*(4), 770-774.
- Luckschander, N., Kleiter, M., & Willmann, M. (2003). [Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, *145*(10), 482-485.

- Luo, T., Zhang, X., Wakeel, A., Popov, V. L., & McBride, J. W. (2008). A variable-length PCR target protein of Ehrlichia chaffeensis contains major species-specific antibody epitopes in acidic serine-rich tandem repeats. *Infect Immun*, 76(4), 1572-1580.
- Machado, R. Z., Duarte, J. M., Dagnone, A. S., & Szabo, M. P. (2006). Detection of Ehrlichia chaffeensis in Brazilian marsh deer (Blastocercus dichotomus). *Vet Parasitol*, 139(1-3), 262-266.
- Magnarelli, L. A., Anderson, J. F., & Schreier, A. B. (1990). Persistence of antibodies to Borrelia burgdorferi in dogs of New York and Connecticut. *J Am Vet Med Assoc*, 196(7), 1064-1068.
- Manyarara, R., Tubbesing, U., Soni, M., & Noden, B. H. (2015). Serodetection of Ehrlichia canis amongst dogs in central Namibia. *J S Afr Vet Assoc*, 86(1), 1272.
- Marconi, R. T., & Garon, C. F. (1992). Phylogenetic analysis of the genus Borrelia: a comparison of North American and European isolates of Borrelia burgdorferi. *J Bacteriol*, 174(1), 241-244.
- Margos, G., Piesman, J., Lane, R. S., Ogden, N. H., Sing, A., Straubinger, R. K., et al. (2014). Borrelia kurtenbachii sp. nov., a widely distributed member of the Borrelia burgdorferi sensu lato species complex in North America. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 1), 128-130.
- Markowicz, M., Ladstätter, S., Schotta, A. M., Reiter, M., Pomberger, G., & Stanek, G. (2015). Oligoarthritis caused by Borrelia bavariensis, Austria, 2014. *Emerg Infect Dis*, 21(6), 1052-1054.
- Marques, A. R. (2010). Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep*, 10(1), 13-20.
- Martinez, M. C., Gutierrez, C. N., Monger, F., Ruiz, J., Watts, A., Mijares, V. M., et al. (2008). Ehrlichia chaffeensis in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis*, 14(3), 519-520.
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., et al. (2001). Borrelia sinica sp. nov., a Lyme disease-related Borrelia species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 5), 1817-1824.
- Mathers, A., Smith, R. P., Cahill, B., Lubelczyk, C., Elias, S. P., Lacombe, E., et al. (2011). Strain diversity of Borrelia burgdorferi in ticks dispersed in North America by migratory birds. *J Vector Ecol*, 36(1), 24-29.
- Mattila, J. T., Munderloh, U. G., & Kurtti, T. J. (2007). Phagocytosis of the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi, by cells from the ticks, Ixodes scapularis and Dermacentor andersoni, infected with an endosymbiont, Rickettsia peacockii. *J Insect Sci*, 7, 58.
- Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., et al. (2006). The genome of the obligately intracellular bacterium Ehrlichia canis reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *J Bacteriol*, 188(11), 4015-4023.
- May, C., Bennett, D., & Carter, S. (1990). Lyme disease in dogs and cats. *Vet Rec*, 127(17), 435.
- McBride, J. W., Zhang, X., Wakeel, A., & Kuriakose, J. A. (2011). Tyrosine-phosphorylated Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia canis tandem repeat orthologs contain a major continuous cross-reactive antibody epitope in lysine-rich repeats. *Infect Immun*, 79(8), 3178-3187.
- Meichner, K., Quorollo, B. A., Anderson, K. L., Grindem, C. B., Savage, M., & Breitschwerdt, E. B. (2015). Naturally Occurring Ehrlichia ewingii and Mycoplasma sp. Co-Infection in a Goat. *J Vet Intern Med*.
- Middelveen-Marianne J., B. J., Sapi Eva, Bandoski Cherly, Filush R. Katherine, Wang Yean, Franco Agustin Timmarauju Arun, Shlinger Hilary A., Mayne Peter J. Stricker Raphael B. (2015). Culture and identification of Borrelia spirochetes in human vaginal and seminal secretions [Research article]. *F1000 Research* 3, 309-315.
- Miklossy, J., Kasas, S., Zurn, A. D., McCall, S., Yu, S., & McGeer, P. L. (2008). Persisting atypical and cystic forms of Borrelia burgdorferi and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation*, 5, 40.

- Miller, J. C., Narayan, K., Stevenson, B., & Pachner, A. R. (2005). Expression of *Borrelia burgdorferi* erp genes during infection of non-human primates. *Microb Pathog*, *39*(1-2), 27-33.
- Mixson, T. R., Ginsberg, H. S., Campbell, S. R., Sumner, J. W., & Paddock, C. D. (2004). Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in adult and nymphal *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) ticks from Long Island, New York. *J Med Entomol*, *41*(6), 1104-1110.
- Munhoz, T. D., Faria, J. L., Vargas-Hernandez, G., Fagliari, J. J., Santana, A. E., Machado, R. Z., et al. (2012). Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Rev Bras Parasitol Vet*, *21*(3), 206-212.
- Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., & Leontides, L. S. (2006). Bone marrow mastocytosis in dogs with myelosuppressive monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study. *Vet Clin Pathol*, *35*(3), 311-314.
- Mylonakis, M. E., Kritsepi-Konstantinou, M., Dumler, J. S., Diniz, P. P., Day, M. J., Siarkou, V. I., et al. (2010). Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J Vet Intern Med*, *24*(3), 633-638.
- Mylonakis, M. E., Xenoulis, P. G., Theodorou, K., Siarkou, V. I., Steiner, J. M., Harrus, S., et al. (2014). Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in experimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet Microbiol*, *169*(3-4), 198-202.
- Nair, A. D., Cheng, C., Jaworski, D. C., Willard, L. H., Sanderson, M. W., & Ganta, R. R. (2014). *Ehrlichia chaffeensis* infection in the reservoir host (white-tailed deer) and in an incidental host (dog) is impacted by its prior growth in macrophage and tick cell environments. *PLoS One*, *9*(10), e109056.
- Nethery, K. A., Doyle, C. K., Zhang, X., & McBride, J. W. (2007). *Ehrlichia canis* gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infect Immun*, *75*(10), 4900-4908.
- Netusil, J., Zakovska, A., Vostal, K., Norek, A., & Stanko, M. (2013). The occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in certain ectoparasites (Mesostigmata, Siphonaptera) of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* in chosen localities in the Czech Republic. *Acta Parasitol*, *58*(3), 337-341.
- Niehaus, C., Valerio, I., Blanco, K., & Chinchilla, M. (2012). [Parasitic infections of coyote, *Canis latrans* (Carnivora: Canidae) in a Costa Rican National Park and a surrounding agricultural area]. *Rev Biol Trop*, *60*(2), 799-808.
- Norte, A. C., Alves da Silva, A., Alves, J., da Silva, L. P., Nuncio, M. S., Escudero, R., et al. (2015). The importance of lizards and small mammals as reservoirs for *Borrelia lusitaniae* in Portugal. *Environ Microbiol Rep*, *7*(2), 188-193.
- Norte, A. C., Araujo, P. M., da Silva, L. P., Tenreiro, P. Q., Ramos, J. A., Nuncio, M. S., et al. (2015). Characterization Through Multilocus Sequence Analysis of *Borrelia turdi* Isolates from Portugal. *Microb Ecol*.
- O'Connell, S., Granstrom, M., Gray, J. S., & Stanek, G. (1998). Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralbl Bakteriol*, *287*(3), 229-240.
- Ogden, N. H., Lindsay, L. R., Hanincova, K., Barker, I. K., Bigras-Poulin, M., Charron, D. F., et al. (2008). Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol*, *74*(6), 1780-1790.
- Ojaimi, C., Brooks, C., Casjens, S., Rosa, P., Elias, A., Barbour, A., et al. (2003). Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect Immun*, *71*(4), 1689-1705.

- Orloski, K. A., Hayes, E. B., Campbell, G. L., & Dennis, D. T. (2000). Surveillance for Lyme disease--United States, 1992-1998. *MMWR CDC Surveill Summ*, 49(3), 1-11.
- Paddock, C. D., & Childs, J. E. (2003). Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 16(1), 37-64.
- Paddock, C. D., Folk, S. M., Shore, G. M., Machado, L. J., Huycke, M. M., Slater, L. N., et al. (2001). Infections with Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia ewingii in persons coinfecting with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 33(9), 1586-1594.
- Panciera, R. J., Ewing, S. A., & Confer, A. W. (2001). Ocular histopathology of Ehrlichial infections in the dog. *Vet Pathol*, 38(1), 43-46.
- Parzy, D., Baudu, P., Normand, T., Audonnet, J. C., & Davoust, B. (2009). Ehrlichia canis phylogenetic analysis of the Borgo (Corsica) strain. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2, 76-78.
- Pat-Nah, H., Rodriguez-Vivas, R. I., Bolio-Gonzalez, M. E., Villegas-Perez, S. L., & Reyes-Novelo, E. (2015). Molecular Diagnosis of Ehrlichia canis in Dogs and Ticks Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *J Med Entomol*, 52(1), 101-104.
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., & Harrus, S. (2009). Use of chimeric DNA-RNA primers in quantitative PCR for detection of Ehrlichia canis and Babesia canis. *Appl Environ Microbiol*, 75(19), 6393-6398.
- Peleg, O., Baneth, G., Eyal, O., Inbar, J., & Harrus, S. (2010). Multiplex real-time qPCR for the detection of Ehrlichia canis and Babesia canis vogeli. *Vet Parasitol*, 173(3-4), 292-299.
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., & Rikihisa, Y. (2006). Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, 110-117.
- Petersen, J. M., Schriefer, M. E., Carter, L. G., Zhou, Y., Sealy, T., Bawiec, D., et al. (2004). Laboratory analysis of tularemia in wild-trapped, commercially traded prairie dogs, Texas, 2002. *Emerg Infect Dis*, 10(3), 419-425.
- Postic, D., Garnier, M., & Baranton, G. (2007). Multilocus sequence analysis of atypical Borrelia burgdorferi sensu lato isolates--description of Borrelia californiensis sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol*, 297(4), 263-271.
- Pretorius, A. M., & Kelly, P. J. (1998). Serological survey for antibodies reactive with Ehrlichia canis and E. chaffeensis in dogs from the Bloemfontein area, South Africa. *J S Afr Vet Assoc*, 69(4), 126-128.
- Procajlo, A., Skupien, E. M., Bladowski, M., & Lew, S. (2011). Monocytic ehrlichiosis in dogs. *Pol J Vet Sci*, 14(3), 515-520.
- Puri, B. K., Shah, M., Julu, P. O., Kingston, M. C., & Monro, J. A. (2014). The association of lyme disease with loss of sexual libido and the role of urinary bladder detrusor dysfunction. *Int Neurourol J*, 18(2), 95-97.
- Reardon, M. J., & Pierce, K. R. (1981a). Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet Pathol*, 18(1), 48-61.
- Reardon, M. J., & Pierce, K. R. (1981b). Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs. *Vet Pathol*, 18(3), 384-395.
- Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., & Shukla, S. K. (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res*, 1(1), 5-12.
- Reeves, W. K., Loftis, A. D., Nicholson, W. L., & Czarkowski, A. G. (2008). The first report of human illness associated with the Panola Mountain Ehrlichia species: a case report. *J Med Case Rep*, 2, 139.

- Richter, D., Schlee, D. B., Allgower, R., & Matuschka, F. R. (2004). Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*, *70*(11), 6414-6419.
- Rodriguez-Vivas, R. I., Albornoz, R. E., & Bolio, G. M. (2005). Ehrlichia canis in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. *Vet Parasitol*, *127*(1), 75-79.
- Rojas, N., Castillo, D., & Marin, P. (2015). Molecular detection of Ehrlichia chaffeensis in humans, Costa Rica. *Emerg Infect Dis*, *21*(3), 532-534.
- Rondelli, M. C., Munhoz, T. D., Catandi, P. B., Freschi, C. R., Palacios Junior, R. J., Machado, R. Z., et al. (2015). Serum DHEA-S increases in dogs naturally infected with Ehrlichia canis. *Res Vet Sci*, *100*, 18-20.
- Rubio R.M.C., G. C. S. M., Enriquez V.I., Cota G.S.C, Castro C.N. (2015). Rhipicephalus sanguineus en caninos en Sinaloa, México. *REDVET*, *16*, 10.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Honig, V., Mallatova, N., Krbkova, L., Mikulasek, P., et al. (2013). Detection of Borrelia burgdorferi sensu stricto ospC alleles associated with human lyme borreliosis worldwide in non-human-biting tick Ixodes affinis and rodent hosts in Southeastern United States. *Appl Environ Microbiol*, *79*(5), 1444-1453.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H., Jr. (2009). Delineation of a new species of the Borrelia burgdorferi Sensu Lato Complex, Borrelia americana sp. nov. *J Clin Microbiol*, *47*(12), 3875-3880.
- Rufino, C. P., Moraes, P. H., Reis, T., Campos, R., Aguiar, D. C., McCulloch, J. A., et al. (2013). Detection of Ehrlichia canis and Anaplasma platys DNA using multiplex PCR. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *13*(12), 846-850.
- Salazar, C. A., Rothemich, M., Drouin, E. E., Glickstein, L., & Steere, A. C. (2005). Human Lyme arthritis and the immunoglobulin G antibody response to the 37-kilodalton arthritis-related protein of Borrelia burgdorferi. *Infect Immun*, *73*(5), 2951-2957.
- Schaefer, J. J., Kahn, J., Needham, G. R., Rikihisa, Y., Ewing, S. A., & Stich, R. W. (2008). Antibiotic clearance of Ehrlichia canis from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. *Ann N Y Acad Sci*, *1149*, 263-269.
- Schuler, W., Bunikis, I., Weber-Lehman, J., Comstedt, P., Kutschan-Bunikis, S., Stanek, G., et al. (2015). Complete genome sequence of Borrelia afzelii K78 and comparative genome analysis. *PLoS One*, *10*(3), e0120548.
- Schulze, T. L., Bowen, G. S., Bosler, E. M., Lakat, M. F., Parkin, W. E., Altman, R., et al. (1984). Amblyomma americanum: a potential vector of Lyme disease in New Jersey. *Science*, *224*(4649), 601-603.
- Schutzer, S. E., Fraser-Liggett, C. M., Qiu, W. G., Kraiczy, P., Mongodin, E. F., Dunn, J. J., et al. (2012). Whole-genome sequences of Borrelia bissettii, Borrelia valaisiana, and Borrelia spielmanii. *J Bacteriol*, *194*(2), 545-546.
- Schwartz, I., Bittker, S., Bowen, S. L., Cooper, D., Pavia, C., & Wormser, G. P. (1993). Polymerase chain reaction amplification of culture supernatants for rapid detection of Borrelia burgdorferi. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *12*(11), 879-882.
- Siarkou, V. I., Mylonakis, M. E., Bourtzi-Hatzopoulou, E., & Koutinas, A. F. (2007). Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of Ehrlichia canis strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Vet Microbiol*, *125*(3-4), 304-312.
- Silveira, J. A., Valente, P. C., Paes, P. R., Vasconcelos, A. V., Silvestre, B. T., & Ribeiro, M. F. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia canis in a Brazilian dog. *Ticks Tick Borne Dis*, *6*(3), 242-245.

- Simpson, C. F. (1974). Relationship of Ehrlichia canis-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. *Infect Immun*, 10(3), 590-596.
- Smetanova, K., Schwarzova, K., & Kocianova, E. (2006). Detection of Anaplasma phagocytophilum, Coxiella burnetii, Rickettsia spp., and Borrelia burgdorferi s. l. in Ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, 312-315.
- Smith, R. D., Sells, D. M., Stephenson, E. H., Ristic, M. R., & Huxsoll, D. L. (1976). Development of Ehrlichia canis, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick Rhipicephalus sanguineus and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. *Am J Vet Res*, 37(2), 119-126.
- Sosa-Guterréz C.G., M. V., Javier Torres, Guadalupe Gordillo-Pérez. (2014). Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. *Biomedical Science and Engineering*, 2014, 7, 884-889.
- Sosa-Gutierrez G. Carolina, V. M., Torres Javier, Gordillo-Pérez Guadalupe (2014). *J. Biomedical Science and Engineering*, 7, 884-889.
- Steere, A. C., Broderick, T. F., & Malawista, S. E. (1978). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am J Epidemiol*, 108(4), 312-321.
- Steere, A. C., Grodzicki, R. L., Kornblatt, A. N., Craft, J. E., Barbour, A. G., Burgdorfer, W., et al. (1983). The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med*, 308(13), 733-740.
- Steere, A. C., & Malawista, S. E. (1979). Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of Ixodes dammini. *Ann Intern Med*, 91(5), 730-733.
- Steere, A. C., Malawista, S. E., Hardin, J. A., Ruddy, S., Askenase, W., & Andiman, W. A. (1977). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med*, 86(6), 685-698.
- Stewart, P. E., Byram, R., Grimm, D., Tilly, K., & Rosa, P. A. (2005). The plasmids of Borrelia burgdorferi: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*, 53(1), 1-13.
- Stockham, S. L., Schmidt, D. A., Curtis, K. S., Schauf, B. G., Tyler, J. W., & Simpson, S. T. (1992). Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi. *Am J Vet Res*, 53(1), 63-68.
- Tamez-G. R., W.-L. O., Arroyave C., Salinas-M. A., . (1992). *Enfermedad de Lyme en Nuevo Leon*. Octubre 1992 Facultad de Medicina U.A.N.L.:
- Tamez-Gonzalez, R. (1994). *Diagnóstico Molecular de Borrelia burgdorferi, Agente Causal de la Enfermedad de Lyme por la Reacción en Cadena de la Polimerasa* Unpublished Inovated and research, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Tamez-Gonzalez Roberto, W.-L. O., Arroyave Carlos, Salinas-Melendez Antonio, . (1992). *Enfermedad de Lyme en Nuevo Leon*. Octubre 1992 Facultad de Medicina U.A.N.L.:
- Tamez González Roberto, G. C. D. (1992). Enfermedad de Lyme: Un ente en espera de ser reconocido. [Review]. *CIENCIAS, I(Phsycolgy, education, medicina)*, 22-25.
- Tamez., R. (1994). *Diagóstico molecular de Borrelia burgdorferi, agente causal de la enfermedad de Lyme, por la reacción en cadena de la polimerasa*. Unpublished Research, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Theodorou, K., Leontides, L., Siarkou, V. I., Petanides, T., Tsafas, K., Harrus, S., et al. (2015). Synovial fluid cytology in experimental acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *Vet Microbiol*, 177(1-2), 224-227.
- Tilly, K., Rosa, P. A., & Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with Borrelia burgdorferi. *Infect Dis Clin North Am*, 22(2), 217-234, v.
- Tinoco-Garcia, L. (2008). Prevalence and Risk Factors for Borrelia burgdorferi Infection in Mexicali, Baja California, a Mexico-US Border City. *Intern J Appl Res Vet Med* 6(3), 5.

- Tsao, J. I., Wootton, J. T., Bunikis, J., Luna, M. G., Fish, D., & Barbour, A. G. (2004). An ecological approach to preventing human infection: vaccinating wild mouse reservoirs intervenes in the Lyme disease cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(52), 18159-18164.
- Turtinen, L. W., Kruger, A. N., & Hacker, M. M. (2015). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in adult female ticks (*Ixodes scapularis*), Wisconsin 2010-2013. *J Vector Ecol*, *40*(1), 195-197.
- Veinovic, G., Cerar, T., Strle, F., & Ruzic-Sabljić, E. (2014). Influence of MKP medium stored for prolonged periods on growth and morphology of *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *APMIS*, *122*(3), 230-235.
- Vinasco, J., Li, O., Alvarado, A., Diaz, D., Hoyos, L., Tabachi, L., et al. (2007). Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. *J Clin Microbiol*, *45*(8), 2716-2719.
- Walker, D. H., Ismail, N., Olano, J. P., McBride, J. W., Yu, X. J., & Feng, H. M. (2004). *Ehrlichia chaffeensis*: a prevalent, life-threatening, emerging pathogen. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, *115*, 375-382; discussion 382-374.
- Wallis, R. C., Brown, S. E., Kloter, K. O., & Main, A. J., Jr. (1978). Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: field study of ticks. *Am J Epidemiol*, *108*(4), 322-327.
- Waner, T., Rosner, M., Harrus, S., Naveh, A., Zass, R., & Keysary, A. (1996). Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. *Vet Parasitol*, *63*(3-4), 331-335.
- Wang, G., van Dam, A. P., Schwartz, I., & Dankert, J. (1999). Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, *12*(4), 633-653.
- Wenger, N., Pellaton, C., Bruchez, P., & Schlapfer, J. (2012). Atrial fibrillation, complete atrioventricular block and escape rhythm with bundle-branch block morphologies: an exceptional presentation of Lyme carditis. *Int J Cardiol*, *160*(1), e12-14.
- Wetter, D. A., & Ruff, C. A. (2011). Erythema migrans in Lyme disease. *CMAJ*, *183*(11), 1281.
- Willenberg, T., Stanga, Z., Cottagnoud, P., & Stucki, A. (2006). [What is your diagnosis? Erythema migrans ("Bull Eye"). Initial stage of Lyme borreliosis]. *Praxis (Bern 1994)*, *95*(21), 837-838.
- Williams, C. V., Van Steenhouse, J. L., Bradley, J. M., Hancock, S. I., Hegarty, B. C., & Breitschwerdt, E. B. (2002). Naturally occurring *Ehrlichia chaffeensis* infection in two prosimian primate species: ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) and ruffed lemurs (*Varecia variegata*). *Emerg Infect Dis*, *8*(12), 1497-1500.
- Yabsley, M. J., Nims, T. N., Savage, M. Y., & Durden, L. A. (2009). Ticks and tick-borne pathogens and putative symbionts of black bears (*Ursus americanus floridanus*) from Georgia and Florida. *J Parasitol*, *95*(5), 1125-1128.
- Zhang, X., Luo, T., Keysary, A., Baneth, G., Miyashiro, S., Strenger, C., et al. (2008). Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. *Clin Vaccine Immunol*, *15*(7), 1080-1088.
- Zhang, X. F., Zhang, J. Z., Long, S. W., Ruble, R. P., & Yu, X. J. (2003). Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. *J Med Microbiol*, *52*(Pt 11), 1021-1026.