

DETERMINACIÓN DE SALUD Y ENFERMEDADES ZONÓTICAS EN *CANIS LUPUS BAILEYI* Y *CANIS LUPUS OCCIDENTALIS* EN CAUTIVERIO EN EL NORTE Y OCCIDENTE DE MÉXICO

FERNANDO RAFAEL MORALES SOTO

TESIS

Presentado como requisito parcial para

Optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Unidad Laguna

Subdirección de Posgrado



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Unidad Laguna
Dirección de Posgrado

**DETERMINACIÓN DE SALUD Y ENFERMEDADES ZONÓTICAS EN CANIS
LUPUS BAILEYI Y CANIS LUPUS OCCIDENTALIS EN CAUTIVERIO EN EL
NORTE Y OCCIDENTE DE MÉXICO**

TESIS


FERNANDO RAFAEL MORALES SOTO

Elaborado bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS


Comité particular de asesoría

Director:



Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Co- Director:

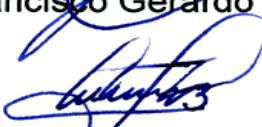


Dra. María Cristina García de la Peña

Asesor:



Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras



Dr. Pedro Antonio Robles Trillo
Jefe del departamento de Posgrado

Dr. Fernando Ruiz Zarate
Subdirector de Posgrado

Torreón Coahuila, México

junio de 2014

Agradecimientos:

A mi gran amiga **Dra. CRISTINA DE LA PEÑA** agradezco tu gran apoyo para terminar este proyecto, además, de ser un gran investigadora, eres una gran persona que siempre ayuda a los demás, amiga, nos falta mucho tiempo y muchas investigaciones por realizar mil gracias de todo corazón por estar en todo momento.

Al **Dr. RAFAEL RODRIGUEZ**, el gran maestro que ha estado presente en todos los planos de mi vida, además, un gran investigador que siempre estuvo a mi lado ayudándome en todo lo que necesite, gracias por que en los momentos difíciles me tendió siempre su mano y por el cual estaré siempre agradecido y bendecido de conocerlo, gracias por su incondicional y sincera amistad. Gracias gran maestro.

Al grupo **CIDE-TORREON** el cual preside mi gran asesora, **Dra. Roció González** gracias por llenarme de conocimientos que son base de mi formación, además de, ser gran amiga, una gran persona me siento bendecido con tu amistad, a **Teresita, Genoveva, Héctor, Oscar, Sergio** gracias por todas sus aportaciones a mi formación y por su amistad.

A los biólogos **Cesar, Norma y Alejandra** porque, el tener personas dispuestas a brindarte su amistad y su trabajo es digno de admirarse y valorarse, muchachos del Laboratorio de Medicina de la Conservación FCB-UJED, Gracias.

Y por último un agradecimiento para el **Zoológico “Santiago de la Monclova” en Monclova, el Parque Zoológico de Irapuato, así como la reserva ecológica: la Reserva de la Biósfera “La Michilía” en SÚchil, Durango**, por permitirme

Contribuir con este gran esfuerzo que se lleva a cabo en muchas partes del mundo por preservar las especies de fauna silvestre y sobre todo por especies en peligro de extinción.

Al **Dr. Francisco Veliz** por toda su asesoría y ayuda en esta tesis.

Dedicatorias

ADios por todo el tiempo que ha estado siempre presente a lo largo de mi vida, así como, la oportunidad que me brindo para obtener el grado, además de darme la sabiduría para ser paciente y lograr los objetivos que siempre trace.

A mi esposa **Paty** mi gran compañera de vida que siempre estas a mi lado y con quien comparto todo lo que soy, gracias, porque en los tiempos difíciles estuviste conmigo en las buenas y las malas, con tu apoyo y tu fortaleza me enseñaste que siempre se pueden lograr los objetivos y mostrarme algunos de los caminos para lograrlo, este trabajo te lo dedico a ti porque un hombre siempre será más fuerte al tener a su lado a una mujer que lo apoye, no alcanzo a agradecer todo lo que haces todos los días pero sobre todo el gran cariño y amor que me tienes a mí y mis hijas GRACIAS.

A mis hijas **Renata** y **Abigail**, que son mi razón de vivir, gracias por todo su cariño, por el tiempo que se ha sido difícil para ellas no verme al ausentarme como papa para terminar este proyecto, valoro todo ese gran amor que me tienen y sus palabras que me ayudaron en todo el camino recorrido. A ti **RENATA** mi angelito que con tu sonrisa y tus caricias me levantaste cada vez que me sentía derrotado, me ensañaste el valor de vivir y ser fuerte aunque los pronósticos no estén a tu favor. A ti **ABIGAIL** mi princesa, que con tus abrazos y cariño me dieron fortaleza en mi camino, ahora hija mía te puedo contestar la pregunta que me hiciste en una noche de esas tantas que me viste trabajando en el estudio: - “ Papa para que sigues estudiando si ya eres grande”, hoy puedo responderte: “es para enseñarte que nunca es tarde para seguir preparándote y seguir apropiándote

deconocimiento, para crecer, seguirte superando y sobre todo porque afuera en la vida real hay un mundo que espera por ti”.

Pedro y Paty, mis suegros les agradezco el estar siempre apoyándome en mi formación tanto científica como personal así como el cariño a mi familia.

A la **UAAAN-UL**. Por darme todos sus conocimientos llevándome a ser un profesional en mi carrera y además por ser parte de mi vida continua gracias mi gran Alma Terra Mater.

Índice

1. AGRADECIMIENTOS:	I
2. DEDICATORIAS	II
3. ÍNDICE	IV
4. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	VI
5. RESUMEN	VII
6. INTRODUCCIÓN	1
7. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ZONOSIS	4
7.1 CLASIFICACIÓN DE LAS ZONOSIS	5
7.2 RICKETTSIAS	6
7.3 CLASIFICACIÓN DE LAS RICKETTSIAS	6
8. PATOGENIA DE LAS RICKETTSIAS	9
9. VECTORES TRANSMISORES	9
9.1 IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS VECTORES	11
10. ÁMBITO DE CAUTIVERIO DE LAS ESPECIES	12
11. AGENTES PATÓGENOS DE IMPORTANCIA ZONÓTICA	14
11.1 ERLIQUIOSIS	14
11.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	18
11.3 BIOECOLOGÍA DE LA ERLIQUIOSIS	18
11.4 PATOGENIA Y CUADRO CLÍNICO	18
11.5 DIAGNÓSTICO	19
12. ANAPLASMOSIS	20
12.1 EPIDEMIOLOGÍA	20
12.2 SIGNOS CLÍNICOS	22
12.3 DIAGNÓSTICO	23
12.4 TRATAMIENTO	23
13. LEPTOSPIROSIS	24
13.1 EPIDEMIOLOGÍA	25
13.2 SIGNOS CLÍNICOS	26
13.2.1 Fase aguda	26
13.2.2 Fase Subaguda	27
13.2.3 Fase Crónica	27
13.3 DIAGNÓSTICO	27
14. DIROFILARIASIS	28
14.1 ETIOLOGÍA	29
14.2 PATOGENIA Y CUADRO CLÍNICO	31

14.3 DIAGNÓSTICO	31
14.4 TRATAMIENTO	32
15. BORRELIA BURDOFIERE	33
15.1 EPIDEMIOLOGIA	33
15.2 SIGNOS CLÍNICOS.....	34
15.3 TRATAMIENTO	35
16. PRUEBAS DE LABORATORIO EN ENFERMEDADES	35
16.1 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA, IFI	35
16.2 CULTIVO EN CÉLULAS VERO	36
16.3 SHELL VIAL	36
16.4 PCR EN TIEMPO REAL.....	37
17. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CARNÍVOROS	37
17.1 TAXONOMÍA.....	38
18. COMPORTAMIENTO Y ECOLOGÍA.....	40
19. JUSTIFICACIÓN	42
20. HIPÓTESIS	43
21. OBJETIVO	43
22. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	43
23. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
23.1 ÁREAS DE ESTUDIO	45
23.2 POBLACIÓN DE LOBOS	46
23.3 SEGURIDAD DEL PERSONAL	46
23.4 EXTRACCIÓN DE SANGRE	46
23.4 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	47
23.4.1 Recuento leucocitario.	47
23.4.2 Recuento de glóbulos rojos.	47
23.4.3 Determinación del Hematocrito.....	48
23.4.4 Hemoglobina.....	48
23.4.5 Prueba IDEXX snap DX4 para la detección de enfermedades transmitidas por vectores.	49
23.6 Perfil lipídico	50
24. RESULTADOS	51
24.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE EL SNAP DX4	52
24.2 PERFILES SANGUÍNEOS.....	52
25. DISCUSIÓN	55
26. CONCLUSIONES	64
27. LITERATURA CITADA	66

Índice de cuadros y figuras

cuadro i. Agentes infecciosos asociados a zoonosis.....	5
Cuadro ii. Enfermedades transmitidas por vectores y su distribución mundial	8
Cuadro iii. Especies de Ehrlichia y Anaplasma en vectores artrópodos implicadas en patología humana.....	16
Figura 1. Ciclo biológico de Ehrlichia (Mohan Kumar <i>et al.</i> , 2013, Dumler <i>et al.</i> , 2007).....	19
Figura 2. Filograma de los miembros del género Anaplasma en la familia Anaplasmataceae.....	21
Figura 3. Ciclo biológico de Anaplasma spp.	22
Figura 4. Ubicación geográfica de las localidades de estudio.	45

Resumen

Los estudio de seroprevalencia, y hematologías en las especies en cautiverio son de gran utilidad para el conocimiento de los patógenos y las condiciones de salud que puedan afectar la adaptación, reproducción y vida de estas especies al medio en el que se desenvuelven, siendo además un diagnóstico clínico de importancia al darnos datos interesantes para la prevención y tratamientos de los procesos patológicos presentes. Para detectar la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocitophilum*, *Leptospira canicola*, *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, además de los parámetros sanguíneos y perfiles lipídicos en carnívoros silvestres mantenidos en cautiverio en zoológicos y reservas en el norte y occidente de México, se utilizaron muestras de sangre recolectadas de 6 lobos mexicanos y 20 lobos grises. Para la determinación de los anticuerpos se utilizó la prueba de ELISA (SNAP DX4 PLUS), y hematología para establecer los parámetros hematológicos de los animales muestreados. Se obtuvieron un dato positivo para anaplasma, dos para dirofilaria, y dos para ehrlichiosis, mientras que para leptospirosis y borrelia no hubo casos positivos. Los valores hematológicos obtenidos se encontraron dentro de los parámetros normales, pero no así los datos de colesterol y triglicéridos, en los que se observaron fuera de los parámetros normales con los datos podemos afirmar que las condiciones demográficas de los cautiverios pueden influenciar la presencia de enfermedades de salud y zoonosis en los lobos que se encuentran en protección en resguardos ,parque o reservas, y por lo cual los estudios realizados nos sirven para un mejor control y manejo de las especies en peligro de extinción como el lobo mexicano, además de tener la vigilancia de enfermedades que pueden causar un perjuicio tanto como los trabajadores como a los visitantes y sobre todo a las especies en cautiverio para la preservación de su especie de estos lugares.

Palabras claves: *Canis lupus baileyi*, *Canis lupus occidentalis*, seroprevalencia, hematología, cautiverio, zoonosis, *Anaplasma phagocitophilum*, *Ehrlichia canis* .

INTRODUCCIÓN

Introducción

Al igual que en otras partes del mundo, en México gran parte de la diversidad biológica se pierde a consecuencia de las enfermedades que afectan a la fauna silvestre. Con el fin de lograr un mejor entendimiento de la dinámica de las enfermedades en áreas donde converge una gran variedad de especies, es necesario conocer los factores ecológicos que pueden favorecer las tasas de transmisión de los agentes infecciosos, así como las implicaciones que éstos pueden tener en la conservación (Susan, 2000).

Los carnívoros son muy sensibles a las perturbaciones de su hábitat; su disminución y desaparición puede utilizarse como un indicador de los cambios en los ecosistemas. Disminuciones recientes en poblaciones silvestres de carnívoros demuestran que las enfermedades infecciosas tienen efectos devastadores en su conservación. La conversión del hábitat debido a las actividades antropogénicas ha amplificado el papel que tienen las enfermedades como reguladoras en la supervivencia de los carnívoros (Leschnik et al., 2012b).

La incidencia de enfermedades provoca cambios en la conducta de individuos en diferentes poblaciones tanto en vida libre como en cautiverio, afectando así procesos evolutivos y ecológicos que regulan la biodiversidad. A partir del deterioro del ambiente se han instrumentado una serie de medidas que intentan mantener, recuperar o aumentar poblaciones silvestres a través del manejo del hábitat o del manejo directo de la fauna. Hasta la fecha, han sido pocos los programas de manejo de fauna silvestre que han tomado en cuenta de manera sistemática el estudio de las enfermedades, lo que constituye un serio riesgo de salud animal y pública. El éxito de los programas de manejo de fauna depende del conocimiento del perfil epidemiológico de las poblaciones que se manejan. En este sentido, en México es necesario que el biólogo y el médico veterinario amplíen su campo de acción hacia este tipo de actividades con el fin de que contribuyan a conservar esa diversidad biológica, no sólo necesaria para nuestro país, sino para todo el mundo (Susan, 2000).

Los cánidos (familia Canidae) se incluyen en el suborden Caniformia. Los primeros cánidos norteamericanos evolucionaron para adaptarse a la persecución de presas en zonas abiertas, adquiriendo cuerpos macizos, grupas algo caídas y extremidades prolongadas y resistentes, con locomoción digitígrada. En la actualidad la familia Canidae agrupa un total de 16 géneros y 36 especies que habitan de forma natural en todos los continentes, exceptuando Australia y otros territorios insulares. Los representantes actuales de la familia Canidae suelen dividirse en dos grandes grupos: el “linaje del lobo” que incluye los géneros *Canis*, *Lycaon*, *Cuon*, *Speothos*, *Atelocynus*, *Nyctereutes*, *Cerdocyon*, *Chrysocyon*, *Lycalopex* *Pseudalopex*; y el “linaje del zorro” incluyendo géneros como *Vulpes*, *Urocyon* *Otocyon* (Garrido and Arribas, 2008).

Los animales silvestres rescatados son mantenidos en cautiverio, situación que conlleva a un constante estrés, donde primarán sus capacidades adaptativas produciéndoles diversos grados de sufrimiento al no encontrarse en su hábitat natural. Mantenerlos en condiciones saludables incluye realizar un buen control de diferentes enfermedades que los afectan, en especial las enfermedades parasitarias, que son comunes por hacinamiento, el estrecho contacto al que son sometidos los animales de una misma especie y de diferentes especies silvestres y en ciertos casos con especies domésticas (Beltrán-Saavedra *et al.*, 2009).

Las zoonosis son enfermedades que se transmiten en forma natural de los animales domésticos o silvestres a los humanos (Hubálek, 2003). Éstas conforman un grupo complejo de padecimientos infecciosos generados por una amplia variedad de organismos entre los que se encuentran bacterias, virus, hongos, protozoos, helmintos y algunos artrópodos (Shimshony, 2008); representan un grupo de aproximadamente 200, muchas de ellas con repercusión como problema de salud a nivel mundial (Acha and Szyfres, 2001). En años recientes se han presentado brotes de enfermedades zoonóticas producidas por patógenos nuevos y la reemergencia de enfermedades producidas por patógenos ya conocidos en diferentes familias animales (Patz *et al.*, 2004).

Beallet *al.*(2012)evaluaron la exposición de *Canis lupus familiaris* tres diferentes especies de *Ehrlichia* en las regiones sur y centro de los Estados Unidos. Obtuvieron muestras sanguíneas de 8662 perros siendo estas sometidas a pruebas de ELISA para detectar anticuerpos de *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, obteniendo una seroprevalencia de 0.8%, 2.8% y 5.1%, respectivamente. Algo importante es que la mayor seroprevalencia de *E. canis* (2.3%) se encontró en una región que abarca Arkansas, Louisiana, Oklahoma, Tennessee y Texas, estados ubicados en la región sur de los Estados Unidos.

Características generales de las zoonosis

Las enfermedades zoonóticas son aquellas que son transmisibles en condiciones naturales entre los animales y el hombre.Los problemas económicos, demográficos y sociales, son los factores predisponentes en los países en vías de desarrollo, constituyendo un grave problema de salud pública.En muchos de estos casos, estas enfermedades tienen un impacto en la economía por afectar tanto a personas como a animales, siendo éstas transfronterizas.Entre las enfermedades de mayor importancia se encuentran la tuberculosis, hidatidosis, ántrax, fasciolosis, cisticercosis,rickettsiosis y leishmaniosis, tomando en cuenta que estas pueden prevalecer en el medio central urbano y periurbano de la población (Botelho-Nevers and Raoult, 2007, Vallat, 2009, Acha and Szyfres, 2003, McBride and Walker, 2010, Sidoti and Tringali, 2009, Beugnet et al., 2009), Ver Cuadro 1

cuadroi. Agentes infecciosos asociados a zoonosis

Bacterias	Virus	Parásitos	Hongos
<i>Bartonellahenselae</i>	<i>Flavivirus</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Cryptococcusneoformans</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Hantavirus</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Histoplasma</i> spp.
<i>Brucella</i> spp.	<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Isospora belli</i>	<i>Microsporium canis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Taenia</i> spp.	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>		<i>Toxocara canis</i>	
<i>Ehrlichia canis</i>		<i>Toxocara cati</i>	
<i>Leptospira</i> spp.		<i>Toxoplasma gondii</i>	
<i>Listeria</i>		<i>Trichinella spiralis</i>	
<i>Monocytogenes</i>			
<i>Salmonella enteritidis</i>			

(Dabanch, 2003)

7.1 Clasificación de las zoonosis

Para la OMS (Organización Mundial de la Salud) Las zoonosis se han clasificado en referencia a su huésped reservorio. Por una parte el hombre y en segundo lugar los animales vertebrados inferiores.

Una Antropozoonosis es una infección transmitida al hombre por los vertebrados inferiores y zooantropozoonosis es una infección del hombre a los vertebrados inferiores.

Las zoonosis se dividen en 4 categorías que son

1) Zoonosis directas.

Son las que se transmiten de un huésped vertebrado infectado a un huésped vertebrado susceptible por contacto directo, por contagio de un objeto directo o por mediación de un vector mecánico.

2) Ciclozoonosis.

Son aquellas en las que el agente infeccioso debe pasar por más de una especie de huésped vertebrado, pero por ningún huésped invertebrado concluyendo su ciclo evolutivo.

3) Metazoonosis.

Son las transmitidas por vectores invertebrados, donde el parásito se multiplica, se desarrolla o efectúa los dos procesos en el invertebrado y la transmisión a otro huésped vertebrado es difícil a menos que realice un periodo de incubación extrínseca.

4) Saprozoonosis.

Son las que tienen un huésped vertebrado y un lugar de desarrollo o reservorio no animal, donde estos son fómites, suelos y plantas.

7.2 Rickettsias

Las rickettsiosis pertenecen al grupo de enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia*. Estas enfermedades constituyen un grave problema sanitario y de impacto mundial, ya que afectan a sectores amplios de la población. Asimismo, son de gran importancia debido a la dificultad del diagnóstico y a las complicaciones y los desenlaces fatales que ocurren por un diagnóstico y tratamiento tardío. Las bacterias del género *Rickettsia* son patógenos responsables de numerosos brotes de enfermedades alrededor del mundo, causando serios problemas, proyectando cuadros clínicos en la población y causando pandemias. En México, la recopilación e interpretación de la información sobre las rickettsiosis es importante debido a que, teniendo un panorama más claro, se puedan orientar acciones de salud pública para realizar labores de vigilancia epidemiológica (Sidoti *and* Tringali, 2009, McBride *and* Walker, 2010).

7.3 Clasificación de las Rickettsias

El género *Rickettsia* pertenece a la familia Rickettsiaceae (también incluye *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Bartonella*), dentro del orden de los Rickettsiales. Está constituido por diferentes especies de bacterias gram negativas y todas tienen en común el ser parásitos intracelulares obligados debido a su corta viabilidad fuera de sus reservorios y vectores (Bernabeu-Wittel, 2005; (Abarca et al., 2008, McBride *and* Walker, 2010, Sidoti *and* Tringali, 2009).

Las Rickettsias son las bacterias más frecuentemente transmitidas por ectoparásitos y algunas de las especies son altamente patógenas para los humanos, causando brotes severos con elevadas tasas de mortalidad. Asimismo, las Rickettsiosis representan un reto para la salud pública debido a la complejidad social asociada a las actividades cotidianas humanas, la dificultad del diagnóstico por la asociación con otras enfermedades febriles tipo dengue y malaria con quienes comparten la mayoría de los hallazgos clínicos, por la concepción popular dominante de las enfermedades y, por la aparición en zonas de alta vulnerabilidad social (Buitrago, 2009, McBride and Walker, 2010, Tique et al., 2008).

Las Rickettsiosis se transmiten naturalmente entre los animales y el hombre, generalmente desde los hospederos reservorios animales al humano a través de la picadura de una variedad de artrópodos, entre los cuales se encuentran los piojos, las pulgas y las garrapatas. Cada uno de estos artrópodos está asociado con una o varias enfermedades Rickettsiales y son fundamentales para mantener ciclos zoonóticos dentro de la naturaleza, permitiendo el mantenimiento de las infecciones (Buitrago, 2009, McBride *and* Walker, 2010).

Según la norma NOM-032SSA2-2002, las Rickettsiosis forman parte de una amplia gama de enfermedades que dan pauta a padecimientos transmitidos por vectores como piojos, pulgas y garrapatas, en los cuales las presentaciones de los cuadros clínicos se caracterizan por fiebre alta, mialgias, artralgias, vasculitis y exantemas. Estas enfermedades son de distribuciones mundial e irregularmente extendidas por todo el mundo, consideradas graves e incapacitantes, con una distribución considerable y a menudo no reconocidas como enfermedades que afectan a las poblaciones de los países subdesarrollados. Ver Cuadro 2.

Cuadroii. Enfermedades transmitidas por vectores y su distribución mundial

Rickettsiosis de las fiebres manchadas y del grupo tifus

Enfermedad	Microorganismo	Vector	Distribución
PIRENEA	<i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalussanguineus</i>	Mediterráneo, África, India, Mar Negro
DEBONEL/TIBOLA	<i>R. slovaca</i>	<i>Dermacentormarginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	Europa
PIRENEA DE ISRAEL	<i>R. conoriiisraelensis</i>	<i>R. sanguineus</i>	Portugal
PIRENEA ASOCIADA A LINFANGITIS	<i>R. sibiricamongolitimonae</i>	<i>Hyalommaasiaticum</i> , <i>H. truncatum</i>	China, África, Francia
PIRENEA	<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa, Japón
PIRENEA	<i>R. aeschlimannii</i>	<i>H. marginatum</i> , <i>R. apendiculatus</i>	Europa, África
PIRENEA	<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Francia
PIRENEA EN ÁFRICA	<i>R. africae</i>	<i>Amblyommahebraeum</i> , <i>A. variegatum</i>	África, Isla de Guadalupe
PIRENEA DE ASTRACÁN	<i>R. conoriicaspensis</i> Kosovo, Chad	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. pumilio</i>	Astracán,
TIFUS GARRAPATAS NORTE DE ASIA	<i>R. sibirica</i>	<i>D. nutalli</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>D. silvarum</i>	Antigua URSS, Pakistán
PIRENEA	<i>R. heilongjiangensis</i> de Rusia	<i>D. silvarum</i>	China, Este
Fiebre manchada de Japón	<i>R. japonica</i> <i>Ixodes ovatus</i> ,	<i>D. taiwanensis</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Japón
Fiebre manchada de las montañas rocosas	<i>R. rickettsii</i>	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. cajennensis</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>R. sanguineus</i>	América
Innominada	<i>R. parkeri</i>	<i>A. maculatum</i>	EE.U.U.
Tifus garrapatas Queensland	<i>R. australis</i>	<i>I. holocyclus</i> , <i>I. tasmanii</i>	Australia
Fiebre manchada islas flinders	<i>R. honei</i>	<i>Aponomahydrosauri</i>	Australia, Tailandia
Innominada	<i>R. marmionii</i>	Desconocido	Australia
Rickettsiosis pustulosa	<i>R. akari</i>	<i>Allodermanyssusanguineus</i>	E E.U.U., Ucrania, Turquía
Tifus murino	<i>R. felis</i>	<i>Ctenocephalidesfelis</i> , <i>C. canis</i>	EE.U.U., México, Europa
Innominada	<i>Candidatus R. kellyi</i>	Desconocido	India
Innominada	<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	España

Fuente: (Oteo and Brouqui, 2005b, Suarez et al., 2008).

Patogenia de las Rickettsias

La patogenia de las Rickettsias es muy similar en las enfermedades Rickettsiales y consiste en una vasculitis de pequeños vasos por una infección directa de las células endoteliales de estos, que origina un infiltrado linfocitocitarioperivascular (Aguero-Rosenfeld, 2003, Blanco et al., 2008). Las Rickettsias, al contactar con las células endoteliales, inducen su propia fagocitosis y, una vez dentro del citosol, escapan del fagosoma y proliferan por fisión binaria simple, siendo finalmente expulsadas por exocitosis para seguir infectando células contiguas (Unvera et al., 2009).

La infección se inicia en la zona de inoculación y posteriormente se extiende célula a célula y por la circulación venosa, lo que finalmente produce una presentación de cientos de focos de vasculitis multisistémica. Según la distribución de las Rickettsias se puede producir neumonitis intersticial, miopericarditis, lesiones vasculíticas cutáneas (el clásico exantema), meningitis linfocitaria, así como afectación hepática, renal y gastrointestinal (McBride and Walker, 2010, Sidoti and Tringali, 2009). Además, una de las principales consecuencias del daño endotelial es el aumento de la permeabilidad capilar que puede desencadenar edema, choque de hipotensión distributivo, hipoalbuminemia e insuficiencia prerrenal secundaria. También es relativamente frecuente la destrucción de plaquetas y la subsiguiente trombopenia, causando el desarrollo de fenómenos hemorrágicos y coagulación intravascular diseminada (Bakken and Dumler, 2008).

Vectores transmisores

Uno de los papeles más importantes de los vectores artrópodos en la vida del hombre y animales es el de la transmisión de bacterias, virus, protozoos y helmintos, muchos de los cuales causan problemas de primer orden como productores y transmisores de enfermedad y muerte (Jongejan and Uilenberg, 2004). Su importancia es fundamental, dado que en su ausencia no se transmiten determinadas enfermedades; basta con mencionar los estragos que han producido a la humanidad, entre otros, las epidemias de peste (*Yersinia pestis*), tífus (*Rickettsia prowazekii*), fiebre amarilla (YF virus), encefalitis, malaria y paludismo (*Plasmodium* sp.) (Parola et al., 2005, Ismail et al., 2010, Pages et al., 2010).

La incidencia de la Rickettsiosis ha venido aumentando en los últimos años, considerándose que las causas de este incremento están relacionadas con el aumento de los vectores y el mayor acercamiento del hombre a los mismos. También se ha comunicado un aumento de enfermedad de Lyme (Hildebrandt *et al.*, 2011) en países europeos, la fiebre de las Montañas Rocosas en Estados Unidos y en otras regiones de América Latina. Por otro lado, un factor que puede incidir sobre la aparición de nuevos focos es la infección natural en algunas especies de garrapatas como *Dermacentor variabilis*, en la que se puede presentar infección con varias especies de *Rickettsia* como *R. bellii*, *R. montanensis* y *R. rickettsii*, esto a pesar de que es aceptado mundialmente que la infección inicial de un artrópodo por una especie de *Rickettsia* previene de la adquisición y la transmisión de una forma secundaria de este patógeno (Blackwell and Leap, 2008, Suarez *et al.*, 2008, Sidoti and Tringali, 2009, Barandika *et al.*, 2007).

Patógenos como *R. rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Anaplasma phagocytophilum* son mantenidos en ciclos naturales, involucrando mamíferos silvestres o garrapatas duras (Ixodidae). La epidemiología de estas enfermedades es un fiel reflejo de la distribución geográfica, las actividades estacionales de los vectores y los reservorios, y de los comportamientos humanos que permiten que los sujetos se pongan en riesgo para un ataque de las garrapatas, y por consiguiente, una infección (Parola *et al.*, 2005, Suarez *et al.*, 2008).

Las garrapatas son ácaros relativamente grandes, con ocho pares de patas en estado adulto y seis en las fases inmaduras. Con raras excepciones, todas las especies son parásitas de vertebrados terrestres y en todos los estadios posteriores al huevo se alimentan de sangre. Existen dos familias de especial interés en la medicina humana: Ixodidae y Argasidae. En la familia Ixodidae (también denominadas “garrapatas duras” por tener un escudo dorsal), los géneros de mayor interés médico son: *Ixodes*, con más de 200 especies, *Haemophysalis*, con 155 especies, *Boophilus*, *Rhipicephalus*, con 70 especies,

Dermacentor, con 30 especies, *Hyalomma*, con 29 especies y, *Amblyomma*, con 102 especies. Las ninfas necesitan ingerir sangre y suelen ascender por la vegetación para esperar allí el paso de un hospedero adecuado, cuya presencia detectan por el olor. Las garrapatas pertenecientes a la familia Ixodidae, particularmente los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Ixodes*, son parásitos frecuentes de los humanos (Dumler et al., 2007, Jongejan and Uilenberg, 2004, Parola et al., 2005, Rejmanek et al., 2012, Suarez et al., 2008).

Algunas garrapatas pueden tener un solo hospedador, pero algunos *Rhipicephalus* requieren dos o tres para completar su ciclo. La picadura no es dolorosa. La mayoría son parásitos de animales silvestres. Pueden ser vectores de enfermedades, en cuyo caso hay transmisión transovárica del patógeno y son de distribución mundial (Jongejan and Uilenberg, 2004, Suarez et al., 2008, Torina et al., 2010, Yabsley, 2010).

9.1 Importancia ecológica de los vectores

La mayoría de las garrapatas tienen una preferencia por alimentarse de ciertos grupos de animales silvestres, siendo algunos huéspedes específicos, debido a esto las relaciones de algunas especies, ya que es poco común que estas especies se relacionen a animales domésticos y humanos, por lo cual estos vectores han adquirido una adaptación exitosa con estos hospederos convirtiéndose en vectores eficiente de una gama de microorganismos patógenos, por lo cual se define que todas las enfermedades transmitidas al humano son de carácter zoonótico. (Jongejan and Uilenberg, 2004)

Debido a esto los criterios ecológicos para considerar a un vector como la garrapata como un patógeno en la relación huésped-patógeno de los vectores con los hospederos son:

- 1) Solo si se alimenta de un huésped vertebrado infectado
- 2) Escapaz de adquirir el patógeno durante la alimentación con sangre
- 3) Se puede mantener el patógeno a través de una o más etapas de su vida
- 4) Puede transmitirlo a otro huésped cuando se alimenta

Por esto la aparición de enfermedades en un medio de relación ecológica es debido a factores climáticos el hábitat y la densidad de población donde afectan a huéspedes, estos vectores o patógenos, que causan enfermedades con frecuencias en aumento (Bengis *et al.*, 2004).

Ámbito de cautiverio de las especies

La historia de la especie humana ha estado estrechamente ligada a su relación con otros animales, que se ha ido plasmando en un uso cada vez más diversificado de éstos. El interés en el bienestar de estas otras especies apareció como una preocupación por los animales de granja en países europeos y en 1965 el Gobierno Británico constituyó el Comité Brambell que revisó el bienestar animal en sistemas de cría intensiva y estableció unos estándares mínimos. En los últimos 20 años ha habido una gran cantidad de publicaciones que ha dado lugar a enormes cambios en la forma de tratar a otros animales (Recuerda *et al.*, 2003).

Los seres vivos estamos contruidos según las demandas de nuestro entorno, es decir estamos adaptados a nuestro medio. Vivimos en ambientes cambiantes y predecibles y a lo largo de la vida cualquier animal se encuentra con condiciones adversas que debe evitar a fin de mantener la homeostasis. Si esto no se consigue se produce una reducción real o potencial de la eficacia biológica del animal, en cuya situación éste sufrirá o se reducirá su bienestar (Recuerda *et al.*, 2003).

Cuando los animales viven en una u otra forma de cautividad se encuentran en ambientes altamente estructurados y predecibles cuya posibilidad de control es máxima, siendo ésta la principal diferencia entre ambientes cautivos y silvestres. La capacidad de control y de predicción está claramente asociada al condicionamiento instrumental y clásico respectivamente y la importancia de éstas como forma de hacer frente a los estímulos aversivos, juega un papel importante en las teorías actuales sobre estrés y bienestar animal (Recuerda *etal.*, 2003).

En 1993, el Consejo Británico para el bienestar de animales de granja (FAWC) decidió reconsiderar los estándares mínimos conocidos como las “cinco

libertades” ya que se referían demasiado a requerimientos espaciales. Asumieron que las necesidades de los animales quedarían cubiertas si se cumple: 1) que estén libres de sed, hambre y malnutrición; 2) que estén libres de incomodidad; 3) que estén libres de dolor, heridas y enfermedad; 4) que sean libres para expresar su comportamiento normal y 5) que no sufran miedo ni angustia.

El apartado tres de las “cinco libertades” (libres de dolor, heridas y enfermedad) debe ser considerado de cómo prioritario para el buen manejo de animales en cautiverio ya que de su monitoreo y control depende su vida. Al respecto se recomienda la colecta de sangre (invasiva pero momentánea) para su análisis (hemograma). Este tipo de estudio es fundamental en la práctica veterinaria cotidiana, sin embargo, en animales no domésticos (fauna silvestre) se complica su realización periódica debido al estrés que provoca la restricción física y a los riesgos y costos que implica la restricción química. A partir de un hemograma se puede determinar la condición general de salud del animal de manera confiable. Algunos de los padecimientos que se pueden diagnosticar mediante este análisis son anemia, leucemia, inflamación, infección, necrosis tisular, estrés, hipersensibilidad sistémica, entre otras. Es por esto que el análisis sanguíneo periódico en animales cautivos significaría una inversión en salud a largo plazo.

Por otra parte, existen algunos parásitos sanguíneos (hemoparásitos) de fauna que son transmitidos por vectores como la garrapata, la pulga y el mosquito. Tal es el caso de protozoarios del género *Babesia* spp., bacterias del género *Anaplasma*, *Rickettsia* y nematodos del género *Dirofilaria*. Estos parásitos pueden causar depresión, letargia, anorexia, fiebre, anemia, vómito, etc., lo cual comprometerá su salud a corto y mediano plazo. Un estudio hemoparasitoscópico periódico permitirá detectar la infección y proporcionar tratamiento adecuado al animal en cautiverio.

El estudio del perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol y LDL-colesterol) brinda un panorama de la condición en la que se encuentran las reservas energéticas de los animales cautivos, los cuales al encontrarse en espacios reducidos o en ausencia de prácticas de enriquecimiento pueden

acumular un exceso de grasa que a mediano plazo provocará problemas hepáticos, pancreáticos, cardíacos o renales. De ahí la importancia de analizar estos compuestos y brindar el tratamiento adecuado en caso de ser necesario.

Como parte de los conocimientos de línea base de las especies mantenidas en cautiverio es de suma importancia determinar las bacterias oronasales que habitan en los individuos. Los agentes aerobios aislados con mayor frecuencia son *Pasteurellamultocida* y *Staphylococcus aureus*. Pueden encontrarse *Pasteurellaseptica*, *Pasteurellacanis*, *Pasteurelladagmatis*, *Streptococcus* spp., *Moraxella* spp., *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp., *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Bergeyella zoohelcum* y bacterias NO-1. Entre los agentes anaeróbicos estrictos se encuentran *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* spp. y *Veillonella parvula* (DiNubile and Lipsky, 2004). Asimismo, los parásitos intestinales deben ser monitoreados periódicamente para evitar infestaciones que mermen la salud del animal. Es común el reporte de especies de parásitos como *Ancylostoma* spp., *Isospora* spp., *Toxascaris* spp., *Toxocara* spp., *Dipylidium* spp., *Trichuris* spp., *Coccidia* spp., *Cryptosporidium* spp., *Capillaria* spp., *Eimeria* spp., entre otras (Ortega-Alvares and McGregor-Fors, 2013, Martínez-Moreno F.J. et al., 2007, Rodríguez-Vivas and Cob-Galera, 2001).

Agentes patógenos de importancia zoonótica

11.1 Erliquiosis

La erliquiosis fue definida en 1945 por Paul Ehrlich (Sidoti and Tringali, 2009) es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por *Ehrlichia canis*, *E. ewingii* y el género *Anaplasma* (Faria et al., 2011). La enfermedad es históricamente endémica de las regiones tropicales y subtropicales y en la actualidad se reconoce su aparición en regiones templadas y de temperaturas variables, atribuyéndose esto a factores antropogénicos que influyen directamente en la distribución de las garrapatas (Vieira et al., 2013).

Erliquiosis es un nombre genérico para designar a las infecciones intracelulares obligadas de la familia Anaplasmae, un agente zoonótico transmitido por vectores con hospederos animales. Se relaciona con factores ambientales asociados con los niveles de pobreza, el hacinamiento y la falta de higiene características de los países en vías de desarrollo en donde existen condiciones favorables para una mayor incidencia por el alto número de migraciones de poblaciones humanas hacia ecosistemas no habituales. La sobreexplotación de los recursos naturales y el nivel de pobreza aumentan las probabilidades de infección del ser humano dada su relación con los reservorios y los vectores de los agentes infecciosos contribuyendo a la propagación de este tipo de zoonosis. Se describe como una enfermedad transmitida a los seres humanos y a otras especies como perros, gatos y a otros animales domésticos, mermando la calidad de la homeostasis corporal, afectando tanto a ancianos, mujeres embarazadas, como a niños pequeños (McGinley-Smith and Tsao, 2003, Barandika et al., 2007, Muffly et al., 2008, Martinez et al., 2008, Marsilio et al., 2006).

La Erliquiosis se transmite por la mordedura de la garrapata en el cuerpo, ya que éstas son parásitos artrópodos hematófagos obligados que parasitan a varias clases de vertebrados; estos artrópodos son considerados frecuentemente, después de los mosquitos, como vectores de enfermedades infecciosas en humanos (Olano et al., 2003, Casati et al., 2008). Ver Cuadro 4.

Cuadro iii. Especies de Ehrlichia y Anaplasma en vectores artrópodos implicadas en patología humana.

Especie	Diana	Vector	Distribución geográfica
<i>E. chaffeensis</i>	Monocitos	<i>Amblyommaamericanum</i> <i>Dermacentorvariabilis</i>	Norteamérica Centroamérica
<i>A. phagocytophilum</i>	Granulocitos	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa Norteamérica Norte de África
<i>E. ewingii</i>	Granulocitos	<i>A. americanum</i>	Norteamérica
<i>Neorickettsiasennetsu</i>	Monocitos	Desconocido	Japón y Malasia

Fuente: (Suarez *et al.*, 2008, Unvera *et al.*, 2009, Rikihisa, 2011).

La erliquiosis es producida por una bacteria llamada *Ehrlichia*, coco gramnegativo de aproximadamente 0.5 a 1.5 μm de diámetro, con tropismo por las células sanguíneas y que reside en una vacuola fagocitaria en donde se replica (Manna *et al.*, 2004, Dumler *et al.*, 2007).

La *Ehrlichia* proviene de las α -proteobacterias (Doudier *et al.*, 2010), que incluye a *Neorickettsiasennetsu* (el agente de la fiebre senetsu), *Anaplasma phagocytophilum*, *E. ewingii* y *E. chaffeensis*. Las erliquias infectan células específicas de varias especies animales y el humano, incluyendo leucocitos mononucleares y polimorfonucleares, así como células endoteliales. Entre las células afectadas se encuentran granulocitos, monocitos, macrófagos y plaquetas, y son la causa de un proceso febril sistémico tanto en los seres humanos como en varias especies animales domésticas y silvestres donde el ciclo de la bacteria en la naturaleza se encuentra entre un artrópodo reservorio (garrapata) y un hospedero mamario, teniendo que tener adaptaciones para permitir la supervivencia en el cuerpo (Oteo and Brouqui, 2005a, Olano *et al.*, 2003, Paddock and Childs, 2003, Bakken and Dumler, 2008). Los vectores encargados de la transmisión son las garrapatas del género *Ixodes* donde un gran

número de este complejo está envuelto en la transmisión de varias enfermedades para animales y humanos como la Lymeborreliosis, encefalitis por mordedura de garrapata, erliquiosis y babesiosis(Casati et al., 2008, Paddock and Childs, 2003).

Las erliquiasresiden dentro de los neutrófilos o granulocitos endosómicos que carecen de marcadores de maduración, y crecen dentro de estas vacuolas formando micro colonias de bacterias llamadas mórulas. La supervivencia de la bacteria en la célula está influenciada por un complejo molecular y caminos bioquímicos envueltos en la adquisición de hierro, ya que se tiene documentado que la baja de este elemento en el citoplasma de las células reduce la replicación de la bacteria(Paddock and Childs, 2003, Bakken and Dumler, 2008).

La erliquiosis puede ser diagnosticada por varias pruebas como: medición de títulos específicos de anticuerpos, detección de mórulas en sangre periférica o leucocitos en fluidos cerebrospinales, detección de DNA de erliquia por PCR en sangre o en fluidos cerebrospinales, detección directa de erliquia por muestra de tejidos por inmunohistoquímica y aislamiento de la bacteria (Paddock and Childs, 2003, Bakken and Dumler, 2008).Siendo detectadas en Europa, el continente asiático y el americano. En la actualidad, la mayoría de los pacientes con esta enfermedad han sido diagnosticados con el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA), utilizando el formato original de esta prueba de para la detección de anticuerpos reactivos a erliquiosis con un antígeno o un sustituto de *E.canis* como sustrato. Actualmente el estándar para la prueba de inmunofluorescencia indirecta para erliquiosis humana es la prueba Arkansas, que utiliza una cepa de *Ehrlichia chaffeensis* cultivada en células vero o en células DH82 como sustrato más frecuente; otro método para diagnosticar la enfermedad en humanos es la utilización de PCR. Esta se puede utilizar cuando hay un historial en el paciente que en el momento en la prueba serológica fue negativa, buscando el principal objetivo molecular para el diagnóstico de erliquiosis humana que es el Gen rRNA 16S; este gen también ha sido el más utilizado para identificar el DNA de *E.*

chaffeensis en garrapatas y animales vertebrados reservorios (Paddock and Childs, 2003).

11.2 Clasificación taxonómica

La clasificación en el orden filogenético de *Ehrlichia* es:

Reino: Bacteria

Phylum: Proteobacterias

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rickettsiales

Familia: Anaplasmataceae

Género: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*
(Ulrich and Zhulin, 2010).

11.3 Bioecología de la erliquiosis

El ciclo de desarrollo de la erliquiosis se lleva a cabo entre los mamíferos y los artrópodos vectores (garrapatas) que han demostrado la transmisión transradial, los factores ecológicos y de desorden de territorio humano tal como el desplazamiento poblacional de los vectores artrópodos, el entorno geográfico, físico, la composición o degradación de los suelos, la biodiversidad de la flora, la hidrología y la humedad del suelo, y la densidad de poblaciones silvestres que actúan como reservorio de estos vectores, ya que tanto la fauna silvestre como la local tienen un papel importante en la distribución del vector y sus agentes patógenos (Sidoti and Tringali, 2009).

11.4 Patogenia y cuadro clínico

La bacteria llega al hospedero a la sangre tras la mordedura de la garrapata, infectando a los leucocitos circulantes junto con las células endoteliales; penetran en el interior de las células por fagocitosis y ya en el interior inhiben la fusión fagosoma-lisosoma y retrasan la apoptosis celular, facilitando la multiplicación de

las bacterias; éstas se aglomeran en el citoplasma formando inclusiones llamadas mórulas (Rotondano *et al.*, 2012). Las mórulas se producen en pocos días y se encuentran en la sangre periférica, en medula ósea, vasos sanguíneos del hígado y bazo y en el caso de *Ehrlichia*, fijándose en los leucocitos causando leucopenia, ocasionando graves trastornos de inmunosupresión, favoreciendo la aparición de enfermedades oportunistas (Oteo and Brouqui, 2005b).

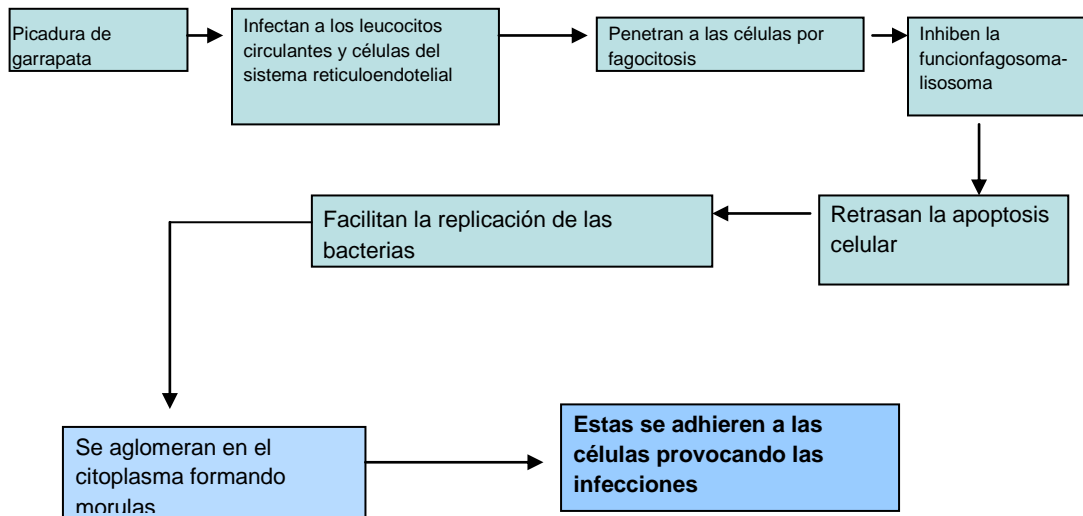


Figura 1. Ciclo biológico de *Ehrlichia* (Mohan Kumar *et al.*, 2013, Dumler *et al.*, 2007).

11.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar dependiendo de la etapa en la que se encuentre. En la etapa temprana se puede realizar frotis sanguíneos para detectar mórulas en células sanguíneas. En la fase aguda de la infección, la detección serológica de anticuerpos puede llevarse a cabo mediante pruebas como inmunofluorescencia indirecta (IFA) o Western Blot, además de otras pruebas que ayudan en el diagnóstico como lo son inmunofluorescencia directa en biopsias de tejido (Rotondano *et al.*, 2012, Oteo and Brouqui, 2005b).

Otra prueba que en los últimos años ha tenido auge en el diagnóstico de la Erliquiosis es la detección molecular de la bacteria por identificación del primer del gen 16S rRNA, característico de esta infección (Rotondano *et al.*, 2012).

Anaplasmosis

12.1 Epidemiología

Esta infección es causada por la bacteria *Anaplasma phagocytophilum* (antes *Ehrlichia equi*, *E. phagocytophilum*), en humanos conocida como Erliquiosis granulocítica humana (HGE). Es un coco intracitoplásmico obligado que pertenece a la familia Anaplasmataceae. La estructura de la pared celular externa de esta bacteria se asemeja mucho a la de las bacterias Gram-negativas. Esta bacteria infecta a los granulocitos teniendo preferencia por los neutrófilos y eosinófilos donde se producen vesículas en la membrana formando microcolonias que se denominan mórulas. Este microorganismo es transmitido por las garrapatas *Ixodes scapularis*, *I. pacificus*, *Rhipicephalus persulcatus* y *Dermacentor silvarum* (Blanco *et al.*, 2008)

Este organismo fue descrito por primera vez como un patógeno veterinario tras haberse identificado en leucocitos de ovejas. En Europa fue conocida como la fiebre de las garrapatas siendo descrita en el ganado bovino, ovino, cabras, ciervos y caninos en 1968. Los primeros reportes en humanos fueron en California, Estados Unidos en 1982 identificado como *Anaplasma phagocytophilum* siendo llamada granulocítica humana, (Kahlon *et al.*, 2013, Dong *et al.*, 2013, St Clair and Decker, 2012, Carrade *et al.*, 2009). Además se han encontrado otros mamíferos domésticos y de la vida silvestre que albergan el patógeno, aunque la enfermedad clínica no se ha descrito (Leschnik *et al.*, 2012a). Ver Figura 2.

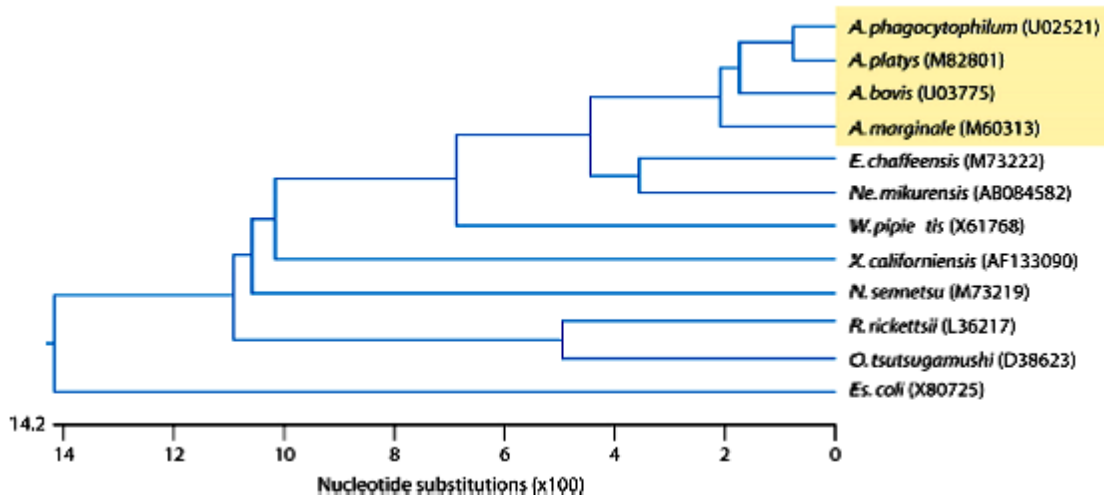


Figura 2. Filograma de los miembros del género *Anaplasma* en la familia Anaplasmataceae.

El género *Anaplasma* se resalta en amarillo. Se construyeron árboles filogenéticos basados en 16S ARN; la alineación de secuencias fue por el método Clustal W utilizando el programa MegAlign del paquete Lasergene. Adhesión GenBank los números se muestran entre paréntesis (Rikihisa, 2011).

Ciclo de vida de *Anaplasma phagocytophilum*. Existen diversas cepas de *A. phagocytophilum* en la naturaleza y la susceptibilidad en las especies de mamíferos varía. Esta bacteria no se puede transmitir de manera efectiva de las garrapatas adultas infectadas de *Ixodes sp.* a los huevos. De esta manera, las larvas no están infectadas. Las garrapatas en la larva, ninfa, o etapa adulta adquieren a *A. phagocytophilum* través de la alimentación de la sangre de los animales infectados. Una vez infectada en la etapa larval o ninfal, *A. phagocytophilum* se mantiene en las garrapatas través de la metamorfosis y muda a la siguiente etapa de la vida y se transmite a los animales a través de la alimentación de sangre cuando el hospedero animal es susceptible a la cepa en particular. Los seres humanos son susceptibles a cepas limitadas, son el hospedero “callejón sin salida” de *A. phagocytophilum* y no son una parte normal del ciclo de vida de esta bacteria o de las garrapatas. La susceptibilidad de las especies animales a las cepas putativas de *Anaplasma* mostrados es una propuesta, la mayoría de las cuales no ha sido probada experimentalmente (Rikihisa, 2011).

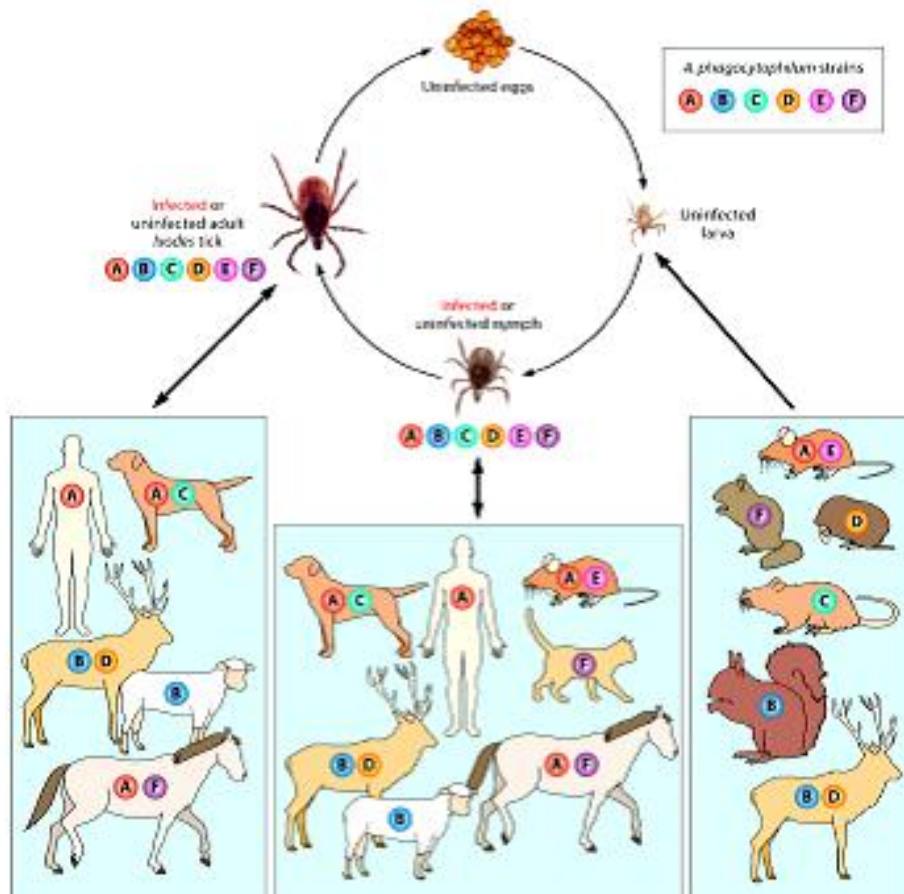


Figura 3. Ciclo biológico de *Anaplasma* spp.

11.2 Signos clínicos

Uno de los signos característicos de la infección de la enfermedad se parece a una gripa o a una infección subclínica. Los animales que manifiestan la enfermedad asociada con la infección aguda pueden presentar fiebre, letargo, malestar general, anorexia y dolor muscular general que resulta en la renuencia a moverse. Los hallazgos clínicos más frecuentemente observados en los perros que alerten de la infección por *A. phagocytophilum* son dolor en las articulaciones y cojera resultante de poliartritis. Otros signos clínicos menos comúnmente observados incluyen problemas gastrointestinales como vómitos, diarrea o ambos, o síntomas respiratorios tales como tos y respiración dificultosa. Enfermedad del

sistema nervioso central (meningitis) también puede ocurrir, resultando en la actividad convulsiva, ataxia o manifestaciones neurológicas tales como torpeza o estupor, pero estos hallazgos se observan con poca frecuencia. Debido a que muchos animales presentan signos clínicos de poliartritis y posiblemente una historia de exposición a estos insectos, los signos clínicos de la anaplasmosis canina pueden ser indistinguibles de las observadas con la enfermedad de Lyme. Además, ambas enfermedades se transmiten por los mismos vectores de garrapatas y tienen distribuciones geográficas similares (Wu *et al.*, 2013, Dumler, 2012, Jin *et al.*, 2012).

11.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la Anaplasmosis se realiza por diferentes métodos como lo son la microscopia en frotis sanguíneos permitiendo la identificación de los organismos presentes en la sangre (Blevins *et al.*, 2008). Otra de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad es la serología de anticuerpos siendo una de las más simples y más utilizadas (Brouqui *et al.*, 2004, Cardoso *et al.*, 2012). Sin embargo, una de las herramientas más utilizadas para el diagnóstico definitivo de la enfermedad es la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ojogun *et al.*, 2012) ya que el objetivo de esta prueba es determinar las expresiones de las características fenotípicas mediante el análisis del rRNA del gen 16S característico de la Anaplasmosis, además de ser una herramienta rápida, sensible y específica (M'Ghirbi *et al.*, 2012) y muy utilizada en estos tiempos para el diagnóstico determinativo de los géneros que pueden causar la enfermedad en las diferentes especies.

11.4 Tratamiento

El tratamiento de elección para la Anaplasmosis en los caninos es la doxiciclina (5 mg/kg cada 12 horas PO durante 2 semanas). La mayoría de los caninos muestran una mejoría clínica a las 24-48 horas de tratamiento antibiótico inicial, donde estudios demuestran que 2 de cada 8 perros infectados necesitan hasta 6 días de tratamiento con tetraciclina para la resolución completa de la infección

Las combinaciones de imidacloprid y el fipronil y permethrin y (S) methoprene se ha demostrado para prevenir la transmisión de *A. phagocytophilum* (Carrade *et al.*, 2009).

Leptospirosis

La Leptospirosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial que afecta a animales silvestres y domésticos. El causante de esta enfermedad es una espiroqueta que pertenece al género *Leptospira* identificado en 1915 en Japón, perteneciente a la familia Leptospiraceae y donde se conocen dos especies, *L. interrogans* con las cepas patógenas y *L. biflexa* compuesta por cepas saprófitas (Brett-Major and Lipnick, 2009, Truong and Coburn, 2011) .

Aunque varias especies de leptospiras causan enfermedades en humanos y animales la gravedad de la presentación es multifactorial; suele presentarse en lugares tropicales en desarrollo aunque su distribución es mundial. Actualmente es considerada como una enfermedad infecciosa emergente debido al contacto con orina de roedores y la exposición a aguas contaminadas con *Leptospira*. Los perros, el ganado, los murciélagos y lobos marinos son un ejemplo de la diversidad de especies de mamíferos que pueden facilitar la transmisión de la leptospirosis como enfermedad zoonótica (Truong and Coburn, 2011, Narayanavari *et al.*, 2012, Monahan *et al.*, 2009a).

En algunas presentaciones en animales se observa un equilibrio biológico entre hospederos particulares y determinados serotipos de leptospiras, por ejemplo, *Leptospira* serotipo *borgpeterseni* Hardjo y *Leptospira* *interrogans* serotipo Hardjo en el ganado bovino, *Leptospira* *interrogans* serotipo *canicola* en perros, *Leptospira* *interrogans* serotipo *pomona* en los cerdos y *Leptospira* *interrogans* serotipo *copenhageni* en rata. En ellos el mantenimiento de la infección es clínicamente asintomática y la leptospira activa una evasión de la respuesta inmune a colonizar los túbulos renales por donde se elimina (Monahan *et al.*, 2009b, Monahan *et al.*, 2009a).

13.1 Epidemiología

La forma de la transmisión es por medio de la orina ya que es su forma de excreción del organismo. La *Leptospira* contamina el suelo y los líquidos de su entorno al tener contacto con los materiales infectados o aerosoles que contaminan el medio ambiente con la orina; además de la vía transplacentaria, también se puede infectar por medio de la leche o los tejidos infectados. Las *Leptospiras* patógenas viven en los riñones de sus hospederos naturales. Además, los tractos genitales de animales domésticos actúan como sitios de persistencia (Hartskeerl *et al.*, 2011).

Una amplia gama de especies de mamíferos son portadores. Los seres humanos se consideran hospederos definitivos, aunque un informe reciente ha demostrado que las personas pueden mantener las leptospiras en determinados ecosistemas; estas se excretan en la orina en el medio ambiente donde pueden sobrevivir durante varios meses, dependiendo de las condiciones ambientales favorables (Forbes *et al.*, 2012). La infección de un hospedero accidental se produce a través del contacto directo con la orina o indirectamente a través de un medio contaminado con orina contaminada. Las leptospiras también pueden ser excretadas en los productos de aborto en las especies de animales domésticos. Las leptospiras patógenas entran a través de cortes o abrasiones de la piel, a través de las membranas mucosas de los ojos, la nariz (inhalación de aerosoles contaminados), la boca (el consumo de bebidas contaminadas y la transmisión de la cadena de depredadores) y genital (animales domésticos); la penetración a través de la piel debilitada por agua es controvertida. A diferencia de los hospederos naturales, los hospederos accidentales suelen desarrollar la enfermedad (Hartskeerl *et al.*, 2011, Guerrier and D'Ortenzio, 2013).

Las leptospiras no se replican fuera del hospedero y requieren de condiciones ambientales apropiadas para garantizar su sobrevivencia ya que a temperaturas por encima de los 50 °C sufren desecación. Hay diferentes especies que actúan como agentes reservorios del agente patógeno como el ganado, (ovino, vacuno,

porcino) y el perro, además esta enfermedad es común en animales de vida silvestre pero los principales portadores de *Leptospira* a nivel mundial son los roedores (Roca, 2006).

13.2 Signos clínicos

Las leptospiras patógenas invaden persistentemente los riñones de los animales reservorios, los cuales son asintomáticos; por su parte los seres humanos son hospederos accidentales pero son susceptibles a la enfermedad (Hartskeerl *et al.*, 2011). En los humanos se presentan desde la enfermedad leve subclínica hasta la enfermedad grave que se caracteriza por ictericia, insuficiencia renal aguda y hemorragia pulmonar. Los síntomas no específicos como fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, dolores musculares, dolor abdominal y sufusión conjuntival son comunes durante la fase aguda. Estos son seguidos por un plazo de tres días de desaparición de la fiebre. En la segunda etapa de la enfermedad, denominada fiebre inmunológica puede generarse una meningitis aséptica. Además se pueden presentar manifestaciones clínicas como, fiebre, mialgias, dolor de cabeza, escalofríos, diarrea, náuseas y vómitos, oliguria/anuria, ictericia conjuntival, meningitis aséptica, hemorragias, dolor de articulaciones, erupciones de la piel, tos, arritmia cardíaca y delirio (Hartskeerl *et al.*, 2011, Guerrier y D'Ortenzio, 2013, Fraga *et al.*, 2011).

13.2.1 Fase aguda

Las leptospiras entran al hospedero a través de las abrasiones de la piel o a través de mucosas como la conjuntival, nasal o la oral, además de la ingestión de agua contaminada que puede facilitar el acceso del germen por las mucosas digestivas (esto ocurre de 4 a 10 días). Una vez dentro del hospedero el patógeno circula por sangre replicándose y distribuyéndose por todo el organismo. En esta primera fase puede existir pleocitosis. Las leptospiras se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos y provocan una vasculitis que ocasiona extravasación produciendo hemorragias e hipovolemia (ésta afecta al hígado y riñones pero puede afectar a

cualquier órgano). En riñones provoca nefritis intersticial y necrosis tubular; en hígado existe un infiltrado centro lobular y proliferación de las células de Kupffer; en pulmones hay hemorragias parenquimatosas y en músculos hay vacuolización de las miofibrillas, tumefacción y necrosis focales.

13.2.2 Fase Subaguda

Es similar a la aguda pero menos grave.

13.2.3 Fase Crónica

Después de la invasión generalizada se produce el aborto por degeneración placentaria provocado por la invasión septicémica de la enfermedad. El aborto ocurre en la segunda fase de la preñez pero puede ser en cualquier momento.

13.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la Leptospirosis se basa en la sospecha clínica y la confirmación de laboratorio. Además, se emplean métodos como el examen microscópico directo e indirectos (Microaglutinación-lisis (MAT) y ELISA), o inmunofluorescencia directa, así como la histoquímica y las tinciones histológicas especiales.

El aislamiento de leptospiras en la sangre o líquido cefalorraquídeo puede intentarse durante la fase leptospirémica durante la primera semana de la enfermedad. Los anticuerpos se detectan en la sangre de 5-7 días después de la aparición de los síntomas, aunque la administración precoz de antibióticos puede detener su desarrollo. Las metodologías serológicas se utilizan para detectar anticuerpos específicos IgM de leptospiras en la fase aguda temprana de la enfermedad, pero la serología de falsos negativos se pueden encontrar en las muestras tomadas antes de 5 a 7 días de los síntomas. Las pruebas de detección son capaces de revelar anticuerpos IgM con una sensibilidad más alta durante la segunda semana de la enfermedad (Forbes et al., 2012, Hartskeerl et al., 2011, Brett-Major and Lipnick, 2009).

ELISA es por lo general la prueba de elección para detectar la presencia de anticuerpos de la clase IgM. Un título elevado de IgM en una sola muestra de suero o un aumento de 4 veces en el título es positivo con la infección actual o reciente, aunque un anticuerpo de clase IgM puede ser detectable durante varios meses o años después de la infección. La ELISA IgM utilizada como Unidad de Referencia de Leptospiray que se ha demostrado que tienen una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 94 % en comparación con el MAT, el método de referencia estándar(Forbes *et al.*, 2012, Hartskeerl *et al.*, 2011).

Todas las pruebas de detección positivas deben ser confirmadas por el MAT. El MAT es una prueba de serogrupo específica donde el suero del paciente se hace reaccionar con suspensiones de leptospiras vivas o formolizadas. Los anticuerpos aglutinantes pueden ser de ambas clases IgM e IgG y son detectables a partir de alrededor de 7 a 10 días después de la aparición de los síntomas. La confirmación de un caso de sospecha clínica de leptospirosis en el laboratorio también tiene muchos inconvenientes. La prueba de aglutinación microscópica (MAT), son complicados y laboriosos, además requieren laboratorios bien equipados, con personal experimentado y, por lo tanto, se limitan a unos pocos centros especializados. MAT es la prueba de referencia en el diagnóstico serológico(Forbes *et al.*, 2012, Hartskeerl *et al.*, 2011).

Dirofilariasis

Es una infección causada por el nemátodo *Dirofilaria immitis* con diferentes sinonimias como: dirofilariosis, verminosis cardiaca, enfermedad por gusanos cardiacos o enfermedad del corazón. Los hospederos definitivos y reservorios de la dirofilariasis son el perro doméstico, cánidos silvestres, gato doméstico, mustélidos (hurones), lobos y zorros. La distribución de la enfermedad es mundial y en algunos países es endémico como en el caso de Australia, así como en el continente europeo especialmente el norte de Italia y España(Tarello, 2011, Otranto *et al.*, 2011, Morchon *et al.*, 2012).

Diversos estudios realizados en zonas endémicas han investigado qué especies de vectores son agentes transmisores de la dirofilariasis. Se han realizado capturas de los mosquitos vectores a través de estudios de campo utilizando trampas de cebo de animales. Estos estudios se han realizado en varias zonas del planeta (Estados Unidos, Brasil, Italia, Irán) donde se han utilizado tanto animales como humanos como cebo (Morchon *et al.*, 2012, Fu *et al.*, 2013).

Aproximadamente 70 especies de mosquitos culícidos principalmente de los géneros *Culex*spp., *Aedes*spp., *Anopheles*spp., *Culiseta*spp., son considerados vectores potenciales de los animales y en el caso de humanos a la dirofilariasis transmitidas por el género *Culex*spp. (Morchon *et al.*, 2012)

14.1 Etiología

El ciclo de la dirofilariasis requiere de un mosquito hembra que ingiera sangre de un mamífero susceptible a *Dirofilarias*spp., y que tenga larvas de primer estado en circulación (L1), denominadas microfilarias. Una vez que el mosquito ingiere las microfilarias, estas migran desde el intestino al hemocele, para después desplazarse hacia los túbulos de Malpighi en 24 a 36 horas, donde penetran hacia el citoplasma de las células primarias (Simon *et al.*, 2012).

Los primeros cuatro días el parásito se vuelve móvil, se acorta y ensancha tomando forma de “salchicha”. Estas formas larvarias del parásito vuelven a entrar al lumen de los túbulos de Malpighi cerca de 5 días después de la infección. La primera muda ocurre a los 8 a 10 días transformándose en L2, fase durante la cual se forman los órganos internos. La muda a larvas L3 ocurre a los 12 a 13 días después de la infección, tomando la apariencia de adultos en miniatura (Simon *et al.*, 2012).

Durante los siguientes días crecen en longitud. Tras aproximadamente dos semanas de desarrollo, las L3 ya infectantes migran a través del cuerpo del

mosquito hasta el espacio cefálico, llegando a las glándulas salivales y probóscide, donde aguardan a que el mosquito se alimente.

La probóscis picadora del mosquito se proyecta hacia delante, es larga, delgada y adaptada para perforar y absorber sangre. La hipofaringe posee un conducto salivar que libera anticoagulante. Las L3 de *Dirofilariaspp.* atraviesan la punta del labelo, rompiendo la membrana quitinosa de la probóscis llegando, de esa forma, a la piel del nuevo huésped junto con una gota de hemolinfa que impide su desecación. Finalmente ingresan al mamífero por el canal de la picadura.

Las larvas L3, de aproximadamente 1mm de largo, penetran al mamífero a través de la perforación de la piel provocada por el mosquito, y luego migran por los tejidos a localizaciones intermedias como membranas submusculares, tejido subcutáneo, subserosas, tejido adiposo y ocasionalmente a los músculos. La muda a L4 ocurre entre 2 y 12 días después de la inoculación, pudiendo demorar hasta 70 días y llega a medir cerca de 1,5 mm de largo. Las L4 pueden encontrarse en los tejidos anteriormente mencionados hasta 4 meses antes de mudar a adultos juveniles y entrar en la circulación venosa. La transformación de L4 a L5, ocurre 50 a 70 días post inoculación. El estado larval L5 de adulto inmaduro tiene una gran movilidad y capacidad de penetración en los tejidos, lo que explica las frecuentes localizaciones ectópicas. (Kittleson y Kienle, 2000; Urquhart *et al.*, 2001).

A los 70 a 120 días post inoculación penetra en una vena sistémica y es transportada por el torrente sanguíneo hasta las arterias pulmonares, en cuyas ramas terminales quedan fijadas; de esta forma ingresa al sistema cardiopulmonar. Las arterias del lóbulo caudal reciben un mayor flujo sanguíneo, sobre todo la arteria pulmonar caudal derecha y, por lo tanto, en ellas se aloja un mayor número de filarias. (Kittleson y Kienle, 2000; Urquhart *et al.*, 2001).

En los pulmones maduran por alrededor de 3 meses más. En el momento en que los gusanos alcanzan las arterias pulmonares miden de 20 a 40 mm de largo. A

los 85 a 120 días después de la infección alcanzan longitudes de 3.2 a 11 cm (Kittleson y Kienle, 2000; Urquhart *et al.*, 2001).

Los principales factores que condicionan la difusión de la enfermedad son ambientales: temperatura y humedad. El tiempo de maduración de la larva en el mosquito depende en gran medida de la temperatura ambiental, entre 25 y 32° C. y 60 a 90% de humedad se completa el desarrollo de la microfilaria (Fu *et al.*, 2013).

14.2 Patogenia y cuadro clínico

Las patologías provocadas por *Dirofilaria immitis* en animales y humanos son numerosas y graves, siendo más comunes las siguientes: endoarteritis pulmonar proliferativa, hipertensión pulmonar, hipertrofia e insuficiencia cardiaca derecha, alteración del parénquima pulmonar, lesión renal, lesión hepática, otras alteraciones orgánicas y síndrome de la vena cava. Por otro lado, *Dirofilaria repens* causa cierto tipo de lesiones ectópicas, como lo son: eritemas, pápulas, alopecia, hiperqueratosis, formación de costras, nódulos, acantosis, edemas y conjuntivitis oculitis en humanos (Schmidt *et al.*, 2011, Otranto *et al.*, 2011).

14.3 Diagnóstico

El diagnóstico físico de la dirofilaria se basa en la presencia de lesiones pruríticas de la piel, con el hallazgo de microfilarias de *D. repens*, y una prueba negativa para antígenos circulantes de *D. immitis*. La diferenciación también es posible usando la técnica histoquímica para el ácido fosfatasa en el cual el sedimento de sangre centrifugada se tiñe con alfa fosfato ASTR naftilo; la fosfatasa evidencia dos áreas de actividad de color rojo ladrillo para microfilarias de *D. immitis* y sólo un área en el extremo posterior de *D. repens*. La PCR es hoy en día muy utilizada en el diagnóstico además de poder diferenciar otras enfermedades como la dermatitis atópica y otras ectoparasitosis pruríticas (Tarello, 2011).

14.4 Tratamiento

El tratamiento con adulticidas para dirofilarias debe ser realizado exclusivamente con clorhidrato de melarsomina. El protocolo estándar de la administración es de dos inyecciones intramusculares cada 24 h en dosis de 2.5 mg/kg. Este protocolo de dos inyecciones sólo mata a aproximadamente el 90% de los gusanos adultos. El protocolo alternativo de tres dosis (una dosis única seguida de dos inyecciones, que se administran al menos 30 días después de la inyección inicial y 24 h de diferencia) mata a 98% de los gusanos. Además, la primera dosis única de melarsomina elimina 90% de los parásitos machos y 10% de hembras, que conduce a una reducción de seguro 50% de la carga total de parásitos, disminuyendo así la posibilidad de complicaciones embólicas y permitiendo la recuperación del organismo antes de la siguiente aplicación de dos dosis, que eliminará el resto de los gusanos adultos. La terapia adulticida conduce inevitablemente al desarrollo de tromboembolismo pulmonar, especialmente en los casos con altos niveles sistémicos de parásitos muertos. El riesgo de esta condición puede reducirse mediante la restricción de la actividad física durante 30 a 40 días después del tratamiento adulticida y mediante la administración de heparina y glucocorticoides cuando sea necesario (Simon *et al.*, 2012).

La ivermectina tiene un efecto adulticida parcial si se administra a una dosis de 6 a 12 mg/kg de peso corporal mensual por 16 meses, y la eficiencia puede alcanzar el 100% si el tratamiento se extiende a 30 meses. Sin embargo, no se recomienda la administración de lactonamacrocíclico como el tratamiento de elección debido a que el efecto adulticida requiere un periodo de tratamiento extremadamente largo. A lo largo de este período, la enfermedad continúa en progreso con el consiguiente daño a la salud del perro y, potencialmente, el desarrollo de trombos que puede ocurrir impredeciblemente. Algunos investigadores han observado que la salud de los animales tratados con ivermectina durante 24 meses puede empeorar (Tarello, 2011).

El tratamiento quirúrgico se realiza en perros utilizando pinzas de cocodrilo flexibles introducidos a través de la vena yugular. Este instrumento, guiado con la ayuda de un fluoroscopio, alcanza en la cavidad cardíaca derecha y la arteria pulmonar hasta sus ramas lobulares para extraer los gusanos infecciosos. El riesgo en la técnica intraoperatoria de mortalidad es baja y la supervivencia y la recuperación es satisfactoria (Simon *et al.*, 2012).

Borreliaburdofiere

La enfermedad de Lyme (borreliosis de Lyme) es una zoonosis bacteriana causada por *Borreliaburgdorferi*, que es transmitida por garrapatas del género ixodide, que se pueden clasificar además entre especies de patógenos : *Borreliaburgdorferi* sensu stricto (SS) , de *Borreliaburdofiere*, y *Borreliagarinii*. En los Estados Unidos, sólo se pueden encontrar *B. burgdorferi*, mientras que *B. afzelii* y *B. garinii* causan la mayoría de los casos de la enfermedad de Lyme en Europa y Asia (Berende *et al.*, 2010); en algunos países del continente americano se ha encontrado una incidencia de la enfermedad hasta de 1-3% con una prevalencia acumulada tan alta como 7-15% (Aucott *et al.*, 2012), teniendo así reporte de distribución mundial. Además, este género transmite otras enfermedades como erliquiosis humana, Anaplasmosis, bartonella *etc.* (Scott *et al.*, 2004).

Además, por las enfermedades pueden producir infecciones polimicrobianas cuya interacción y sus efectos plantean serios desafíos para los investigadores que estudian la etiopatogenia de las enfermedades transmitidas por garrapatas, y para los clínicos que serían diagnóstico y tratamiento de la dinámica de enfermedades causadas por ellos. Algunos aspectos de la morbilidad observada en los casos de Lyme después del tratamiento son causados probablemente por procesos inmunes post-infecciosas (Berndtson, 2013).

15.1 Epidemiología

B. burgdorferi se mantiene en la naturaleza a través de un amplio número de animales que actúan como reservorios, y que padecen la fase de espiroquetemia. (Berndtson, 2013). El mecanismo de transmisión más importante de la garrapata al hospedador es la inoculación directa de las espiroquetas a

través de la saliva durante la alimentación del vector, por las regurgitaciones que se producen desde su intestino medio.(Tsao, 2009) El periodo que permanece adherida la garrapata a la piel del animal es determinante para la transmisión, considerándose necesario un tiempo mínimo igual o superior a las 48 horas, siendo el riesgo aproximado al 100 % cuando permanece adherida 72 horas o más, Se ha observado que en garrapatas con un número muy elevado de espiroquetas, éstas pueden atravesar el intestino, alcanzar el hemocele, y desde allí colonizar distintos órganos como los ovarios, pudiéndose transmitir transováricamente a su descendencia También ha sido demostrada la infección de garrapatas infectadas a no infectadas al alimentarse simultáneamente (co-alimentación), incluso con una separación física de un centímetro en el hospedador y en ausencia de infección sistémica, gracias a que la borrelia permanece en el punto de inoculación durante un cierto tiempo antes de producirse la diseminación(Aucott et al., 2012, Berndtson, 2013, Berende et al., 2010).

15.2 Signos clínicos

La enfermedad de Lyme es una afección inflamatoria crónica, multisistémica que afecta principalmente a la piel, sistema nervioso central y periférico, articulaciones y corazón, tras un periodo de incubación medio de 10 días, con un rango de entre 3 y 30 días (Berende et al., 2010) aparece en el lugar de la picadura una lesión primaria denominada “*eritema migrans*” que es patognomónica y clave para el diagnóstico precoz de la enfermedad (Girschick et al., 2009)

Desde esta lesión inicial, se produce una diseminación por vía hematogena al resto del organismo (fase de espiroquetemia) dando lugar según los órganos afectados, a una gran variedad de manifestaciones clínicas como eritemas anulares, anomalías neurológicas, artritis, alteraciones músculo-esqueléticas, alteraciones cardiacas, etc. (Hengge y cols. 2003, Nadelman y Wormser 1998, Nau y cols. 2009). En la fase tardía de la enfermedad entre las principales alteraciones destacan la acrodermatitis crónica atrófica, artritis crónica, encefalomielitis crónica, paraparesia espástica, polirradiculopatía, ataxia,

desórdenes mentales subagudos, etc. (Hengge y cols. 2003, Nadelman y Wormser 1998, Nau y cols. 2009).

La enfermedad puede manifestarse con una gran variedad de síntomas y signos relacionados con la diversidad antigénica de las cepas. Dependiendo del paciente afectado y de la localización geográfica del caso, pueden existir claras diferencias entre las manifestaciones clínicas de los enfermos identificados en Estados Unidos o en Europa.

15.3 Tratamiento

Borreliaburgdorferi es muy sensible a betalactámicos y tetraciclinas; sin ninguna resistencia antimicrobiana a el tratamiento de la enfermedad en manifestaciones tempranas con regímenes orales sencillos es muy eficaz, donde las pruebas con cepas europeas de Borrelia, la doxiciclina oral es tan eficaz como dosis altas intravenosas de betalactámicos. (Halperin, 2010).

.La duración del tratamiento para la enfermedad de Lyme es de 4, 6 o hasta 12 meses dependiendo de cada paciente; se tiene que examinar cada mes para conocer su estado de salud y certificar la mejoría o los fallos que se presenten. Los antibióticos que se administran son: Doxiciclinas, Azitromicinas, penicilinas, Claritromicina, etc., en el caso de la Ceftriaxona es muy problemática puesto que el paciente debe permanecer bajo vigilancia por largos periodos (Girschick et al., 2009)

PRUEBAS DE LABORATORIO EN ENFERMEDADES

16.1 Inmunofluorescencia indirecta, IFI

Esta técnica tiene como fundamento la reacción del antígeno que se encuentra fijado a una lámina con los anticuerpos que se desarrollan en el hospedero durante y después de la infección. Al igual que en la mayoría de infecciones, primero hay una respuesta mediada por anticuerpos de la clase inmunoglobulina M (IgM), que progresivamente va siendo reemplazada por una respuesta más

específica de anticuerpos IgG(Blanco et al., 2008, Agüero-Rosenfeld, 2003, Dumler et al., 2007).

De esta manera, esta prueba parte de la base de que en el suero del hospedero infectado se encuentran anticuerpos específicos que pueden ser detectados si se dirigen anticuerpos marcados contra estas inmunoglobulinas. Este fenómeno se observa bajo el microscopio de fluorescencia. La escala de medición para este ensayo son diluciones crecientes que parten de 1/64, 1/128, 1/256, y así consecutivamente. El diagnóstico por este método requiere muestras pareadas, ya que una sola muestra puede indicar el contacto previo con el microorganismo pero no establece un diagnóstico de infección aguda(Blanco et al., 2008, Agüero-Rosenfeld, 2003, Dumler et al., 2007).

16.2 Cultivo en células Vero

Por ser la rickettsia un microorganismo intracelular, su cultivo implica disponer de células, como sucede con los virus y otras bacterias intracelulares. Estas células, dispuestas en una monocapa, son expuestas a la muestra infectada para obtener el crecimiento intracelular de la rickettsia. Como método diagnóstico es dispendioso, costoso y poco sensible, pero es indispensable para la fabricación de láminas diagnósticas y para la recuperación de la bacteria en tejidos infectados(Blanco et al., 2008, Agüero-Rosenfeld, 2003, Dumler et al., 2007).

16.3 Shell vial

Consiste en viales con una monocapa de células Vero en su tapa, en la cual se deposita el suero o muestra y por centrifugación se expone a la monocapa celular, esperando un crecimiento en condiciones específicas. Las células se “cosechan” y la presencia de microorganismos en ellas se puede hacer por inmunofluorescencia (Blanco et al., 2008, Agüero-Rosenfeld, 2003, Dumler et al., 2007).

16.4 PCR en tiempo real

Mediante un sistema de fluoróforos, se modifica la técnica clásica de la PCR para emitir una señal fluorescente, en la medida que se amplifica el segmento deseado de DNA. Existen múltiples protocolos con diferentes características operativas y costos(Blanco, 2008;Dumbler, 2007;Rikisha, 2008).

Aspectos biológicos de los carnívoros

Los carnívoros constituyen un orden heterogéneo formado por algo más de 200 especies diferentes entre ellas, agrupadas en 8 familias que, a excepción de la Antártida, se extienden por todos los continentes (Rodríguez, 2002). Son mamíferos euterios que se caracterizan por presentar adaptaciones anatómicas orientadas a su dieta (carne), su diversidad en el tamaño y sus adaptaciones; de ahí su tendencia a recurrir a presas que van desde invertebrados a grandes herbívoros. Poseen cuatro dientes grandes y afilados llamados caninos; el cuarto premolar superior y el molar inferior presentan puntas afiladas y bordes mellados utilizados para desgarrar la carne (Servín, 1997), y en 1982, Flynn y Galiano los dividieron en dos subórdenes, Feliformia y Caniformia, suborden Caniformia estos últimos caracterizados por presentar un reborde de la cara lingual de los dientes incisivos y caninos (Garrido and Arribas, 2008).

17.1 Taxonomía

El orden carnívora está representado por cuatro familias incluyendo 8 géneros que suman 13 especies (Cuadro 1).

Cuadro4. Clasificación de las especies de carnívoros silvestres.

Orden	Familia	Genero y Especie	Nombre Vulgar
carnívora	Canidae	<i>canis lupus</i>	Lobo
		<i>Vulpesvulpes</i>	Zorro
	Felidae	<i>Felissilvestris</i>	Gato montes
		<i>Melesmeles</i>	Tejón
		<i>Lutralutra</i>	Nutria
		<i>Martes martes</i>	Marta
		<i>Martes foina</i>	Garduña
	Mustelidae	<i>Mustela putorius</i>	Turón
		<i>Mustela nivalis</i>	Comadreja
		<i>Mustela erminea</i>	Armiño
		<i>Mustela lutreola</i>	Visón europeo
		<i>Mustela vision</i>	Visón americano
	Genettagenetta	Genettagenetta	Gineta

Familia Canidae

Morfológicamente los miembros de la familia Canidae tienen dedos largos, huesos turbínales complejos, caninos largos y fuertes; los machos son más grandes que las hembras y en campo levantan la pata trasera para orinar, mientras la hembra se agacha para orinar; ocupan una gran cantidad de hábitats y son preferentemente carnívoros. Su alimentación incluye vertebrados, artrópodos, moluscos, carroña y una gran variedad de material vegetal, además de ser claramente oportunistas (Jiménez-Guzmán, 1999).

Género *Canis* Linneus

Este género agrupa a los cánidos modernos de tamaño mediano a grande, representados por los lobos, coyotes y chacales. Tienen la característica de presentar un cuerpo alto, extremidades largas y cola cilíndrica bastante poblada. En el cráneo se observa una fuerte cresta sagital. Su sentido del olfato se

encuentra extremadamente desarrollado pudiendo detectar olores de 1 hasta 24 km en el caso de los lobos, los cuales son los cánidos de mayor tamaño y de peso muy variable desde 10 hasta 80 kg, con una conducta de caza normalmente hacia presas de gran talla como ciervos, gamos, alces, caribúes, bisontes y cabras monteses. Son sociales, ya que forman manadas jerarquizadas centradas en una pareja dominante, generalmente de hábitos nocturnos o crepusculares y con límites territoriales que varían mucho de una especie a otra debido a los cambios en su distribución poblacional. (Jiménez-Guzmán, 1999).

Canis lupus baileyi

El lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) ha sido descrito como la especie de menor tamaño dentro de las 24 subespecies de *Canis lupus* reconocidas para América del norte. En la actualidad, esta especie se encuentra extinta en vida silvestre en México y por este estatus es legalmente protegida. Su peso es de 21 a 41 Kg y mide 138 a 180 cm de la punta de la nariz a la punta de la cola; su altura a la cruz es de 65 a 80 cm; su pelaje es corto en verano y tupido en invierno, siendo el color más grisáceo en la espalda y flancos en los especímenes de Chihuahua. En Durango se presentan con una coloración más amarillenta o café. Su cabeza es grande, de hocico largo y macizo, con una crin a manera de melena que crece en la base del cuello a los lados de la cara; además se caracteriza por su colareta, patas grandes y la posición oblicua de sus ojos, La distribución original de esta subespecie se extendía desde el sureste de Arizona, sureste de Nuevo México y el oeste de Texas en Estados Unidos y a lo largo de la Sierra Madre Occidental y planicies adyacentes del oeste de México, hasta el sur del Valle de México. En la actualidad su distribución se encuentra fragmentada en pequeños áreas de Durango y en una pequeña región entre Chihuahua y Sonora (Moctezuma *et al.*, 2004).

Comportamiento y ecología

En los carnívoros que cazan en grupos es muy importante el número de individuos que participan en la captura de sus presas, ya que el éxito está en la acumulación de individuos para asegurar el éxito de la caza y en la depredación de presas de mayor tamaño. En especial, los lobos prefieren pasar la mayor parte del tiempo en las zonas más abiertas (en las partes bajas), que es donde encuentran al ganado, y una de sus conductas más importantes es que para poder cazar, la presa debe estar en movimiento (McBride, 1980).

Servin en 1997 realizó estudios de comportamiento en cautiverio con el lobo mexicano en las cuales destacan 37 conductas agrupadas en 5 categorías: conductas amistosas, sumisas, juegos, sexuales y agonísticas (agresión-defensa)(Servín, 1997).

Los animales con necesidades de espacio amplios , con bajo índice reproductivo, o la susceptibilidad a la persecución humana, como muchos grandes mamíferos carnívoros, se han visto afectados negativamente por la alteración del suelo y la actividad humana asociada con la urbanización (Lynda and John, 2006). El lobo gris (*Canis lupus*) ocupó históricamente la mayor parte de América del Norte y jugó un papel importante y quizás piedra angular en la mayoría de los ecosistemas. Como depredador, el lobo se apropió de muchos componentes de los sistemas naturales, y de aquellos componentes adaptados, que han ido evolucionando con la presencia de los lobos. Sin embargo, como resultado de la colonización europea, el lobo fue extirpado de la mayoría de los 48 estados contiguos de los Estados Unidos, y fue incluido posteriormente en peligro de extinción bajo la Ley de Especies en Peligro (ESA) de 1973. La protección prevista por la ESA, y el cambio en los valores sociales de acompañamiento, fue un momento decisivo en la conservación del lobo(Licht et al., 2010).

Lichtef *al.*(2010)Mencionan que los lobos presentan funciones en relación con los humanos y la ecología como los son:

- Limitar, y posiblemente regular, el crecimiento y la abundancia de las poblaciones de presas
- Eliminar debilitados, heridos, y alterar la proporción de sexos y edad
- Comportamiento de presa influencia, patrones de movimiento, distribución, y el uso del hábitat
- Crear una cascada trófica que afecta a la composición, la estructura, y el funcionamiento de las comunidades de plantas, que a su vez aumenta la disponibilidad de hábitat para los animales
- Crear una cascada trófica afectando a la composición, estructura y funcionamiento de las comunidades de plantas, que a su vez afecte la disponibilidad de hábitat para los animales
- Crear carroña que proporciona alimento para otras especies y ciclos de nutrientes
- Afectar a la abundancia, distribución y comportamiento de otros animales (por ejemplo, coyotes), a través de las interacciones interespecíficas
- Aumentar el ecoturismo y beneficiar a las economías locales
- Mejorar la experiencia de los visitantes, y proporcionar oportunidades para la investigación científica.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de seroprevalencia y los estudios sanguíneos en las especies en cautiverio son de gran utilidad para el conocimiento de los patógenos y las condiciones de salud que puedan afectar la adaptación, la reproducción y la vida de estas especies al medio en el que se desenvuelven, siendo además un diagnóstico clínico de importancia al darnos datos interesantes para la prevención y tratamientos de los procesos patológicos presentes, además de ofrecernos un panorama del estado de salud general de las especies en cautiverio que presenta un entorno de estrés para muchas de estas, lo cual afecta su fisiología natural presentándose inmunosupresiones que predisponen a las especies a la aparición de agentes patógenos oportunistas causantes de enfermedades de importancia para la conservación de las especies de zoológico o aquellas en peligro de extinción.

Hipótesis

Un manejo inadecuado de poblaciones de lobos en cautiverio los predispone a enfermedades zoonóticas.

Objetivo

Determinar el estado de salud de los lobos en cautiverio en el norte -occidente de México surelación con el manejo y la aparición de enfermedades patógenas zoonóticas.

Objetivos específicos:

Determinar la seroprevalencia de agentes patógenos en *Canis lupus occidentalis* y *Canis lupus baileyi*.

Determinar perfiles hematológicos y lipídicos en *Canis lupus occidentalis* y *Canis lupus baileyi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

23.1 Áreas de estudio

Se realizaron muestreos de individuos en dos zoológicos: el Zoológico “Santiago de la Monclova” en Monclova, Coahuila ($26^{\circ}53'26.27''$ N $101^{\circ}22'44.34''$ O) y el Parque Zoológico de Irapuato “ZOOIRA” ($20^{\circ}39'11.17''$ N $101^{\circ}19'47.37''$ O), y en una reserva ecológica: la Reserva de la Biósfera “La Michilía” en Súchil, Durango ($23^{\circ}26'17.29''$ N $104^{\circ}15'56.05''$ O) Fig. 4. En los zoológicos se tomaron muestras a lobos canadienses (*Canis lupus occidentalis*), y en la reserva de la Michilía a lobos grises mexicanos (*Canis lupus baileyi*).

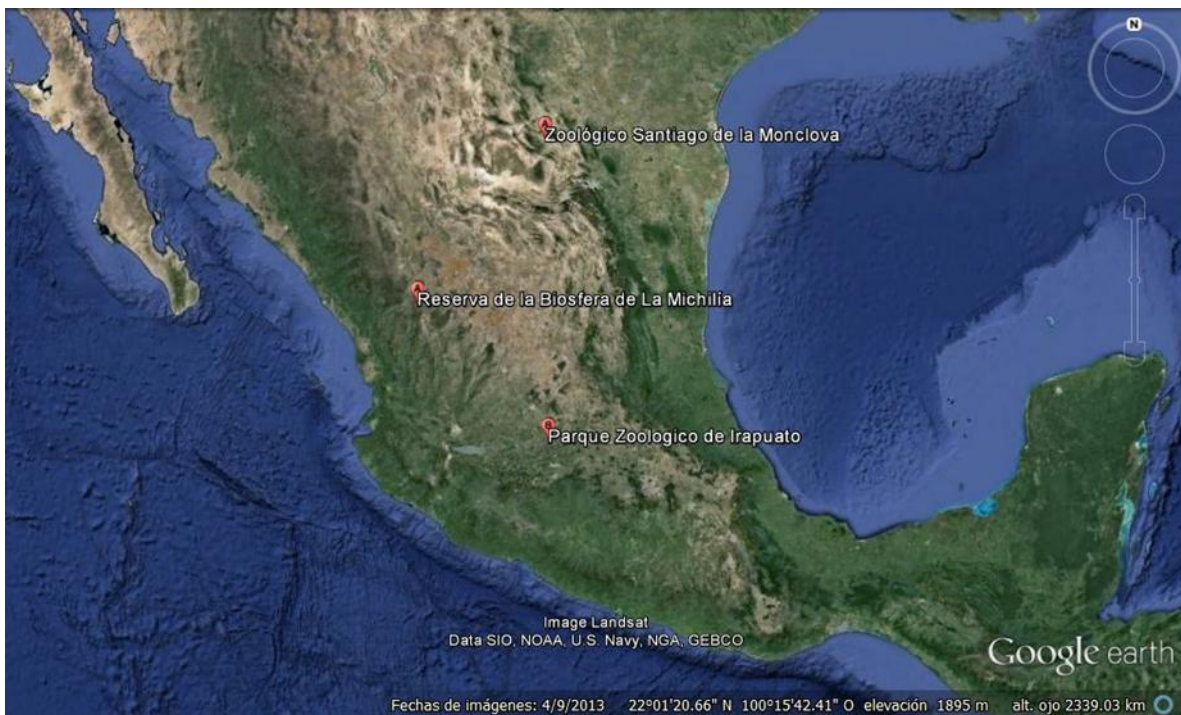


Figura 4. Ubicación geográfica de las localidades de estudio.

23.2 Población de lobos

Fueron estudiados 17 lobos en el zoológico de Monclova, 6 en la reserva de la Michilia y 3 en zoológico zooira.

23.3 Seguridad del personal

Para la colecta de las muestras sanguíneas se utilizó bataprotectora, cubre bocas, gafas de seguridad y un par de guantes de látex para manipular a cada individuo.

23.4 Extracción de sangre

Para preparar la piel del canino para la extracción de sangre se necesitó rasurar el pelo para lograr una mejor visualización de la vena. Luego se limpió la zona de venopunción con alcohol para identificar mejor la vena y eliminar la contaminación macroscópica de la piel y el pelo. La extracción se realizó por medio de jeringas estériles desechables marca BD con aguja hipodérmica calibre 20G X 32 mm. Se extrajeron siete ml de sangre a partir de la vena cefálica, para esto se colocó a los individuos en una superficie plana en posición de decúbito esternal. Una persona sujetó con una mano la cabeza agarrando el hocico y alejándolo del miembro que se utilizó. Con la otra mano se tomó y estabilizó el codo desde el lado, comprimiendo la vena dorsalmente para visualizarla mejor. La compresión en la extremidad se realizó con un torniquete. Para realizar la extracción de sangre se estabilizó la pata y piel sobre la vena con la mano libre, se insertó la aguja acoplada a la jeringa introduciendo la aguja como mínimo 1 cm. Después de retirar la aguja se aplicó una gasa o una torunda de algodón sobre el sitio de la punción para, de esta manera, evitar la hemorragia y que aparezca un hematoma. Dos ml de sangre fueron depositados en tubos vacutainer (Monoject®) con EDTA y 3ml en tubos rojos sin anticoagulante para posteriormente mantenerse a baja temperatura, siendo transportados al laboratorio de medicina de la conservación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED, donde se procesaron las muestras.

23.4 Procesamiento de muestras

23.4.1 Recuento leucocitario.

La sangre se aspiró con una pipeta De Thoma con perla blanca para glóbulos blancos hasta la marca de 0.5; posteriormente se introdujo la pipeta en el tubo con solución de Turk marca Golden Bell® y se absorbió hasta la marca de 11, tratando de que no generara burbujas. Se taparon ambos extremos de la pipeta De Thoma y se procedió a mezclar en un rotador automático por 2 ó 3 minutos. Se montó la laminilla de vidrio en la cámara de Neubauer para recuento, la cual estuvo limpia y seca. Se agitó la pipeta y se descartaron las cuatro primeras gotas para luego colocar una gota de esta solución en la cámara. Se dejó reposar por espacio de 3 minutos para que las células se sedimentaran y posteriormente se procedió a observar en microscopio Óptico Karl Zeiss® con objetivo de 10x y se contaron en los 4 cuadrados grandes angulares de la cámara de Neubauer. Una vez realizado el conteo leucocitario, se aplicó esta fórmula para obtener el valor final de leucocitos / mm³.

$$N^{\circ} \text{ de leucocitos } \times \text{ mm}^3 = \frac{\text{Leucocitos contados en 4 campos}}{\text{altura } \times \text{ dilución } \times \text{ área}}$$

23.4.2 Recuento de glóbulos rojos.

Para realizar el conteo de glóbulos rojos (hematíes), se llenó una pipeta De Thoma con perla roja para glóbulos rojos hasta la marca de 0.5 (para dilución 1/200) o hasta la marca de 1 (para dilución 1/100); posteriormente se llenó la pipeta con diluyente Hayem hasta la marca 101. Se agitó la pipeta en el rotador automático por un lapso de 2 a 3 minutos, y al igual que para el conteo de leucocitos, se descartaron las primeras 3 o 4 gotas y se colocó una en el extremo de la cámara de Neubauer para que se llenara por capilaridad. Se montó la cámara en el microscopio y se procedió a realizar el conteo sobre el cuadrado grande central de la cámara sólo en 5 cuadrados pequeños: uno central y cuatro angulares.

Posteriormente, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el número total de glóbulos rojos (hematíes).

$$N^{\circ} \text{ de hematíes } \times \text{ mm}^3 = \frac{\text{Hematíes contados en 5 cuadros pequeños}}{\text{altura } \times \text{ dilución } \times \text{ área}}$$

23.4.3 Determinación del Hematocrito.

El hematocrito (Htc) se define como el porcentaje de volumen de la sangre que ocupa los glóbulos rojos. Para calcularlo, se introdujo un tubo de capilaridad en el tubo con la muestra de sangre, permitiendo que se llenara. Una vez lleno el capilar, se procedió a sellar uno de sus extremos para evitar la salida de sangre durante la centrifugación. Se colocó el tubo de capilaridad en la centrífuga, asegurándose de que el peso esté equilibrado y se centrifugó durante 6 minutos a 10.000 rpm. Tras la centrifugación, se observó que la muestra quedó dividida en dos fracciones, el plasma por un lado y la fracción celular por el otro y se procedió a calcular el hematocrito obteniendo la longitud total de la sangre en el tubo y la longitud de la fracción celular; se realizó una regla de 3 simple y el resultado se multiplicó por 100 para así obtener el porcentaje total del hematocrito.

23.4.4 Hemoglobina.

La hemoglobina (Hgb) es una proteína de la sangre que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, el dióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan y también participa en la regulación de pH de la sangre. Para el cálculo de este parámetro, se utilizó la siguiente fórmula:

$$Hgb = \frac{Htc (\%)}{3}$$

Volumen de Eritrocitos.

$$\text{Volumen de eritrocitos} = \frac{Hgb}{3}$$

Volumen corpuscular medio (VCM) es la forma de expresar el tamaño de los eritrocitos.

$$VCM = \frac{\text{Hematocrito}}{\text{Eritrocito}}$$

Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH)

$$CCMH = \frac{\text{Hemoglobina}}{\text{Hematocrito}}$$

23.4.5 Prueba IDEXX snap DX4 para la detección de enfermedades transmitidas por vectores.

Con la pipeta del kit se vertieron 3 gotas de suero en un tubo de ensayo, se agregaron 4 gotas de conjugado al tubo de ensayo sosteniendo la botella en posición vertical, se tapó el tubo de ensayo mezclando a fondo invirtiéndolo entre 3 a 5 veces.

Se colocó el dispositivo sobre una superficie horizontal agregando el contenido del tubo de ensayo en el pocillo de muestras teniendo cuidado de no verter el contenido fuera de dicho pocillo.

La muestra fluyó por la ventana de resultados alcanzando el círculo de activación en aproximadamente 30-60 segundos.

En cuanto apareció color en el círculo de activación se presionó el activador con firmeza hasta que quede al ras con el cuerpo del dispositivo

Se leyeron los resultados del análisis después de ocho minutos.

23.6 Perfil lipídico

Las muestras sanguíneas del tubo rojo se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min con la finalidad de obtener el suero. Para la medición de triglicéridos se tomaron 10 µl de suero y se mezclaron con 1000 µl de reactivo de colesterol; luego de agitar bien, se llevó a baño maría a 37°C por 5 min. y finalmente se realizó la lectura. El mismo procedimiento se realizó para la medición de colesterol total utilizando su respectivo reactivo y antes de medir se dejó a temperatura ambiente durante 15 min. Para el HDL-C se tomaron 200 µl de suero y se mezclaron con 500 µl de reactivo Col HDL; dicha mezcla, luego de ser homogeneizada, se dejó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 15 min para luego tomar 100 µl de sobrenadante de cada muestra y mezclarlo con 1000 µl de Col ref. 11506, después se dejó a baño maría a 37°C por 10 min para finalmente realizar la lectura. Las determinaciones del colesterol LDL y colesterol VLDL se estimaron mediante la fórmula de Friedewald: $VLDL-C = TG/5$ y para $LDL-C = CT - (HDL-C + VLDL)$ (15), teniendo en cuenta que este método ha sido validado en especies con patrón HDL como son los caninos, felinos, equinos, bovinos y ovinos. Se utilizaron los reactivos de la casa comercial Spinreact.

RESULTADOS

Resultados

En este estudio se obtuvieron muestras de 26 lobos, 20 de *Canis lupus occidentalis* (17 en el zoológico de Monclova y tres en el zoológico de Irapuato) y seis de *C. l. baileyi* en la Reserva de la Biosfera La Michilía. Dentro de los resultados obtenidos los lobos mexicanos.

24.1 Detección de anticuerpos mediante el SNAP DX4

En general para todos los individuos considerados, se obtuvo un porcentaje de presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* en 7.7% de ellos, de *Anaplasma Phagocitophilum* en 3.8% y de *Dirofilariaspp.* en 7.7%. Tabla 5.

Tabla 5.- Lobos positivos (P) en la detección de anticuerpos mediante el SNAP DX4 PLUS.

INDIVIDUO	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia ewingii</i>	<i>Dirofilariaspp.</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
MONCLOVA					
A					
Lobo 1		P		P	
Lobo14		P		P	
MICHILÍA					
Lobo 4	P				

24.2 Perfiles sanguíneos

Al analizar los perfiles hematológicos y lipídicos se encontraron alteraciones hematológicas en el recuento de eritrocitos en el 7.69% de los individuos, mientras que el resto no presentó ninguna alteración en la hematología; por su parte, se observaron alteraciones en los triglicéridos (23%), colesterol (53.84%), HDL (23.07%) y LDL (42.30%). Estos resultados nos dan el panorama de cómo se encuentran los animales en cuestión de la calidad de vida en cautiverio. Ver Cuadros 6 y 7.

Cuadro 6. Hematología de los lobos considerados en el presente estudio.

Analito	Ht (%)	Hb (gr/dl)	Eritrocitos (x10 ⁶ /ul)	VCM (fl)	CHCM (gr/dl)	Leucocitos (x10 ³ /μl)	Plaquetas (μl)
Referencia(a)	30.6-61.5	10-21.5	4.35-9.21	58.1-78.3	29.3-38.5	4.53-18.53	4.53-18.53 108-454
Monclova							
Lobo 1	51.6	17.2	5.6	92.14*	33.33	9.9	370
Lobo2	51.6	17.2	5.6	92.14*	33.33	13.4	330
Lobo3	53.8	17.9	5.9	91.18*	33.27	7.8	270
Lobo4	44.4	14.8	4.8	92.5*	33.33	13.8	360
Lobo5	56.6	18.8	6.2	91.29*	33.21	9.4	440
Lobo6	55.5	18.5	6.1	90.98*	33.33	10.6	250
Lobo7	59.1	19.7	6.5	90.92*	33.33	9.0	210
Lobo8	54.7	18.2	6	91.16*	33.27	16.3	200
Lobo9	54	18	5.9	91.52*	33.33	13.2	250
Lobo10	54.5	18.1	6	90.83*	33.21	13.3	210
Lobo11	57.4	19.1	6.3	91.11*	33.27	10.5	220
Lobo12	58	19.3	6.3	92.06*	33.27	16.2	240
Lobo13	56.3	18.7	6.2	90.80*	33.21	12.1	240
Lobo14	50.9	16.9	5.6	90.89*	33.20	15.1	250
Lobo15	48.2	16	5.3	90.94*	33.19	7.3	230
Lobo16	53.4	17.8	5.8	92.06*	33.33	13.1	260
Lobo17	57.6	19.2	6.3	91.42*	33.33	14.3	220
Irapuato							
Lobo 1	60.34	20.11	6.63	91.01*	33.32	10.0	150
Lobo 2	57.62	19.2	6.33	91.02*	33.32	11.1	130
Lobo 3	53.57	17.85	5.89	90.95*	33.32	7.9	110
Michilía							
Lobo 1	57.14	19.04	6.28	90.98*	33.32	8.5	ND
Lobo 2	55.35	18.45	6.08	91.03*	33.33	10.9	NST
Lobo 3	63.33*	21.11*	6.96	90.99*	33.33	11.8	NST
Lobo 4	63.49*	21.16*	6.98	90.95*	33.32	12.7	NST
Lobo 5	60	20	6.6	90.90*	33.33	8.9	NST
Lobo 6	52.83	17.61	5.81	90.92*	33.33	9.8	NST

***Valores hematológicos fuera del intervalo normal**

Ht = Hematocrito, Hb = Hemoglobina, VCM = Volumen corpuscular medio, CMHC = Concentración media de hemoglobina corpuscular.

Cuadro 7. Perfiles lipídicos de los lobos considerados en el presente estudio.

Analito	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
Valor de referencia	18-141	100-349	31-117	20-36
Monclova				
Lobo1	118.97	61.53*	41.77	17.25*
Lobo2	197.53*	726.44*	123.46*	27.45
Lobo3	140.33	101.33	56.77	32.16
Lobo4	107.53	83.54*	34.69	46.27*
Lobo5	110.58	69.15*	30.00*	5.49*
Lobo6	98.38	88.06*	34.17	28.24
Lobo7	118.21	80.44*	36.15	14.12*
Lobo8	135.75	107.82	54.69	13.33*
Lobo9	144.90*	104.99	30.10*	7.84*
Lobo10	160.16*	94.55*	43.13	14.12*
Lobo11	105.25	81.85*	42.29	20.39
Lobo12	165.49*	81.85*	54.58	94.12*
Lobo13	95.33	79.87*	41.98	53.33*
Lobo14	219.64*	72.54*	50.94	12.55*
Lobo15	51.86	81.57*	16.35*	6.27*
Lobo16	81.6	66.33*	16.56*	10.20*
Lobo17	52.62	103.87	58.23	32.16
Irapuato				
Lobo 1	118.9	61.5*	41.7	17.2*
Lobo 2	197.5*	126.4	123.4*	27.4
Lobo 3	140.3	101.3	56.7	32.1
Michilía				
Lobo 1	108.473	195.448	58.310	81.505*
Lobo2	66.58	157.144	68.283	5.517
Lobo 3	176.55	162.382	45.983	11.034
Lobo 4	178.04	164.019	47.23	44.389*
Lobo 5	102.48	151.578	51.662	33.856
Lobo 6	71.069	161.727	59.557	3.009

Resultados de perfiles lipídicos. HDL = Lipoproteína de alta densidad "colesterol bueno" LDL = Lipoproteína de baja densidad "colesterol malo"

DISCUSIÓN

Discusión

Entre 1960 y 1975, el lobo mexicano fue exterminado en su hábitat natural como resultado de las campañas de erradicación con el apoyo de los gobiernos de Estados Unidos y México como una respuesta al conflicto de la depredación de ganado (Servín Martínez, 2007). Sin embargo, en 1976 se formó el Programa Binacional México lobo Recuperación (Wolf Recovery Team), cuyo objetivo de este programa ha sido reproducir y localizar a grupos cautivos genéticamente saludables de los lobos, los cuales podrían ser reintroducidos como poblaciones silvestres dentro de su área de distribución histórica. Tanto los EE.UU. y México decidieron retirar de su estado silvestre a los últimos individuos que se encontraban en los estados de Durango y Chihuahua para iniciar un intenso programa de cría en cautividad (Servín Martínez, 2007). Hoy en día, el lobo mexicano se considera extinto en estado silvestre en México (SEMARNAT, 2010)

La Reserva de la Biosfera La Michilía es parte del programa MAB (el Hombre y la Biosfera). Uno de sus objetivos es la conservación de germoplasma en áreas representativas de los ecosistemas naturales para asegurar la continuidad de la diversidad animal y vegetal (Halffter, 1984). Aunado a esta el Instituto de Ecología AC desde 1981 ha participado en el programa de recuperación del lobo mexicano al mantener individuos en cautiverio en un bosque de pino-encino, a 1 km de la Estación Biológica de Piedra Herrada dentro de la Reserva.

Dentro del estudio realizado los lobos parecían estar en buen estado de salud. El lobo número "5", un macho de 13 años, fue positivo para *A. phagocytophilum*. y para confirmar el caso se realizó una segunda prueba confirmando el primer resultado. Los otros cinco lobos fueron negativos para todos los patógenos probados. Tomado en cuenta que de acuerdo con IDEXX (<http://www.idexx.com>) este ELISA SNAP tiene un 99,1% de sensibilidad (95% CL 96,5% - 100%) y 100% de especificidad (95% CL 98% - 100%) para *A. phagocytophilum*.

A. phagocytophilum se trata de un patógeno zoonótico transmitido principalmente por garrapatas de la familia Ixodidae: garrapata del venado (*Ixodes scapularis*), la

garrapata occidental patas negras (*I. pacificus*) y la garrapata americana del perro (*Dermacentor variabilis*) en América del Norte (Rymaszewska y Grenda, 2008). La transmisión transovárica de *Anaplasma* en las garrapatas no se ha determinado, por lo que la bacteria se debe mantener en huéspedes vertebrados de depósito como pequeños roedores, ardillas, ratones de campo, mapaches, zarigüeyas de Virginia, mofeta rayada, ciervos, ovejas, zorros y aves sirven como reservorios capaces de transmitir la bacteria (Ebani *et al.*, 2011, Keesing *et al.*, 2012, Murray *et al.*, 2012). Esta especie hemoparásito causan una enfermedad llamada (anaplasmosis granulocítica) que puede afectar a los seres humanos, así como los caballos, los perros, los rumiantes y las aves (Chen *et al.*, 1994, De La Fuente *et al.*, 2005, Woldehiwet and 2010).

Hay un informe de la anaplasmosis granulocítica aguda en un lobo de madera en cautiverio (*Canis lupus occidentalis*) que permanecía en un área al aire libre en Austria (Leschnik *et al.*, 2012a). El lobo manifestaba signos clínicos como la anorexia, la depresión, y la fiebre, siendo diagnosticada por pruebas serológicas y moleculares para lo cual el lobo recibió terapia de antibióticos (doxiciclina) se inició inmediatamente después del diagnóstico. De acuerdo con Leschnik *et al.* (2012) anaplasmosis granulocítica se sabe que es una enfermedad infecciosa común en los perros (aunque no todos los animales desarrollan signos clínicos), pero en la vida silvestre, anaplasmosis sintomática puede ser una enfermedad rara.

Aunque no hay un informe oficial de la presencia de *I. scapularis* en Durango, Illoldi-Rangel *et al.* (2012) realizó un modelo la distribución de la familia Ixodidae en México mediante el algoritmo de máxima entropía (Maxent). Sus resultados mostraron que el grupo *Ixodes* se distribuiría principalmente en Durango (8.7%), Coahuila (9.6%), Nuevo León (9,9%) debido a que los estados del norte se caracterizan por la presencia de altas altitudes y vegetación templada como el roble y de pino-encino bosques. Por lo tanto es muy probable que en esta región de la michila pueda existir este género de las garrapatas debido a que con la ubicación y el tipo de vegetación que se encuentra en Michilía, el hábitat es adecuado para la presencia de estos Según cuidador de los lobos en Michilía,

menciona que el lobo que fue positivo para *A. phagocytophilum* nunca ha mostrado signos de enfermedad. Así que, ya que el lobo tiene anticuerpos contra el parásito en la sangre, nos indica que tuvo una exposición a la bacteria o posiblemente por una picadura de garrapata y desarrollando aparentemente mecanismos de defensa inmunes necesarias para la supervivencia.

Este hallazgo conduce a más preguntas. Dado que la conservación del lobo mexicano es una prioridad internacional, es importante llevar a cabo estudios sobre los vectores que pueden afectar a estas especies, el ciclo de vida de estos y otros parásitos de la sangre, así como la susceptibilidad a las enfermedades transmitidas por vectores. Por lo tanto es importante determinar la aparición de *I. scapularis* y otros vectores que pueden transmitir *Anaplasma* en Durango como primer paso. También es importante el desarrollo de los estudios inmunológicos para aclarar el potencial del lobo mexicano como reservorio *A. phagocytophilum*.

Los análisis hematológicos y serológicos son herramientas importantes que ayudan a evaluar el estado de salud general como parte de las acciones y estrategias para mantener el bienestar en animales de zoológico y de especies en peligro de extinción en semi cautiverio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las condiciones de cautiverio de los lobos de zoológico no han sido asimiladas ya que reflejan anomalías metabólicas. Los problemas principales que se detectaron en las dos especies analizadas fueron valores anormales del volumen corpuscular medio (VCM), triglicéridos y colesterol. Los altos niveles de triglicéridos indican que las reservas de grasa están aumentadas debido a la buena alimentación, pero indican que los animales carecen de actividad corporal, lo cual sucede comúnmente en los animales de zoológico. De hecho se observó que en el zoológico no se cuenta con un programa de enriquecimiento que pueda brindarle a los individuos la capacidad aumentar la asimilación del cautiverio. Asimismo, puede indicar que la dieta no ha logrado ser asimilada por la especie ya que aun con el control que se tiene de administrarles alimento balanceado y carne de equino sus niveles de lípidos son

anormales. Por lo tanto, se debe implementar un programa de enriquecimiento que mejore la calidad de vida y la salud de estos individuos.

Según Recuerda *et al.*, (2003) un ambiente enriquecido se caracteriza por: a) da al animal control sobre su vida; b) da al animal más posibilidades de elección; c) lleva al animal a realizar comportamientos naturales (especialmente “comportamientos apetitivos”); d) elimina la frustración; e) hace el ambiente más interesante para los animales; f) proporciona un rango completo de interacciones sociales, g) lleva al animal a ser más activo y desarrollar una mayor masa muscular y salud cardiovascular; h) reduce el estrés e incrementa la habilidad de animal para enfrentarse a nuevas situaciones.

El correcto desarrollo de un programa de enriquecimiento ambiental necesita de todas y cada una de las siguientes fases:

- 1) Estudiar la biología de la especie.
- 2) Realizar un análisis de la situación inicial de los animales comparándola con los resultados del estudio de la biología de la especie y de la historia natural.
- 3) Determinar los objetivos que se quieren obtener con el programa de enriquecimiento.
- 4) Elaborar el diseño del programa de enriquecimiento y proceder a su ejecución.
- 5) Evaluación y análisis de los resultados obtenidos

Existen distintos campos en los que se puede realizar un enriquecimiento ambiental para los animales cautivos:

- Ambiente físico (tamaño y forma, complejidad, objetos manipulables, gradientes de elección)
- Alimentación (tipo, forma de presentación, frecuencia, etc.)

- Aspectos sensoriales (visuales, acústicos, olfativos, táctiles, gustativos)
- Ambiente social (intraespecífico e interespecífico)
- Enriquecimiento ocupacional (rompecabezas, objetos manipulables, etc.)
- Interacciones con el hombre (manejo, entrenamiento, etc.)

Los factores a considerar en el diseño de un programa de enriquecimiento son los siguientes:

- Un ambiente complejo no siempre es sinónimo de ambiente enriquecido. Puede proporcionar más alternativas al animal, pero si es estático y poco cambiante no le dará la oportunidad de experimentar cambios.
- Un animal en cautividad desarrolla comportamientos adaptados a las condiciones de cautividad. El objetivo del enriquecimiento ambiental no debe ser eliminar sistemáticamente esos comportamientos. Hay que centrar la atención en buscar la función que tienen los comportamientos y su valor de adaptación, más que intentar reproducir a toda costa los comportamientos observados en la naturaleza.

Todos los animales deben tener ambientes enriquecidos, pero éstos deben ser prioritarios en: a) especies que son generalistas o están adaptadas a ambientes muy variables, b) especies con comportamientos antidepredador complejos, y c) especies que tienen una compleja estructura social.

- El enriquecimiento ambiental puede exponer al animal a riesgos por lo que éstos han de ser valorados antes de actuar.
- A veces un programa de enriquecimiento falla porque no se han utilizado objetos o ambientes adecuados. Debería potenciarse la investigación en sistemas de enriquecimiento variables que permitan que el animal escoja entre diversas opciones.

- Los resultados del enriquecimiento se ven afectados por: la experiencia previa del animal, las condiciones durante el desarrollo, su genética, las variaciones individuales, la edad, el sexo y el contexto social.

- La novedad puede desencadenar miedo y provocar estrés. Un factor crítico que influye en la efectividad del enriquecimiento es el grado de control que tiene el animal a la hora de interactuar con los nuevos estímulos del ambiente.

En la actualidad no se debe pensar en una única definición general del enriquecimiento ambiental, sino que es necesario re-definirlo para cada especie, y quizás para cada individuo. Un programa de enriquecimiento exitoso debe basarse en el análisis de la biología del animal, de su historia individual y de las limitaciones de la instalación que lo alberga, a la vez que proporciona la oportunidad de realizar comportamientos típicos de su especie (Recuerda *et al.*, 2003).

En algunos individuos de los lobos del zoológico de Monclova se observó la presencia de anticuerpos contra *Ehrlichia* y *Dirofilaria*, los cuales son transmitidos por garrapatas y mosquitos, respectivamente. Este zoológico se ubica cerca de la comunidad urbana y no se observó control en cuanto a la entrada y salida de perros callejeros, los cuales pueden transportar las garrapatas y predisponer a infecciones a los lobos cautivos. Al momento de la toma de muestras no se observaron signos de enfermedad en ningún individuo, lo que puede indicar que estas infecciones se encontraban en etapas iniciales. Estas predisposiciones a las infecciones transmitidas por vectores se deben al rompimiento de la triada ecológica de las enfermedades causado por las actividades humanas, dentro de las cuales se encuentra la elevada densidad demográfica, la comercialización de especies en peligro de extinción, cambios en el uso de patrones de suelo y el contacto del hombre con las especies de fauna silvestre y los animales domésticos.

En el caso del lobo mexicano, en un individuo se registró la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma phagocytophilum* pero sin signos clínicos de enfermedad. Al encontrarse en una Reserva de la Biosfera el contacto con personas y animales domésticos es casi nulo, sin embargo, se observó que en áreas vecinas a los encierros del lobo mexicano, se han establecido ranchos privados donde se albergan especies exóticas de rumiantes. Cabe destacar que según la información proporcionada por el encargado de los lobos mexicanos, es frecuente que algunos de esos rumiantes se escapen de esos ranchos y se acerquen a los encierros de los lobos, lo que podría explicar el transporte de garrapatas y la consecuente transmisión de *A. phagocytophilum*. Esto implica un problema grave, ya que se están poniendo en contacto especies que estando en su ambiente natural nunca lo harían. Por otra parte, resalta el hecho de que en una Reserva de la Biosfera cuyo objetivo es conservar la flora y fauna nativa, permitan el cautiverio de especies exóticas que portan sus propios parásitos existiendo el riesgo de transmisión hacia las especies que se trata de proteger, como en este caso, el lobo mexicano.

Palomo *et al.* (2002) mencionan que realizar este tipo de estudios ayuda a determinar el panorama de salud de las especies en cautiverio y la forma en que tratan de adaptarse a su medio ya que con la presencia de enfermedades con potencial zoonótico se pudiera determinar la distribución de estas enfermedades en la fauna. Además, se realizan estudios en otros países mediante técnicas moleculares para tratar de relacionar cómo han evolucionado las garrapatas y las interacciones garrapata-patógeno, conjuntamente con la aparición de estos vectores en el mundo en lo relativo a la distribución mundial, las condiciones climáticas y ambientales de impacto, así como las de primer orden como las IFA en diferentes países para determinar la aparición de estas enfermedades (Paddock y Childs, 2003, Park *et al.*, 2003, Topolovec *et al.*, 2003, Abarca, 2008).

Por todo lo anterior, se deben de implementar estrategias que lleven a la mejor calidad de vida para la preservación de esta especie, como lo son:

La vigilancia epidemiológica

Vigilancia de la salud por medio de monitoreo en las especies.

Acciones de enriquecimiento de las especies dentro del área de contención.

Programas periódicos de análisis clínicos y pruebas serológicas para controlar los hábitos alimenticios y de enfermedades zoonóticas.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Al concluir el presente estudio es evidente que los estudios hematológicos y de seroprevalencia son una herramienta muy útil como estrategia de conservación de especies en confinamiento o en lugares donde se encuentran animales en peligro de extinción, todo esto como parte de las acciones que se llevan a cabo en muchos países para preservar a estos animales. Por otra parte, brindan el panorama de las acciones a realizar para poder mantener a estas especies en un ámbito correcto y poder ofrecerles una calidad de vida adecuada e idónea para el desarrollo de sus actividades diarias en la cual la vigilancia médica es importante para determinar su condición de salud.

La determinación de enfermedades de carácter zoonótico y de importancia clínica en los lobos de zoológico es relevante, ya que afecta a los animales pero también existe el riesgo de que los manejadores y los visitantes puedan adquirir algunas de estas enfermedades al estar en contacto con estas especies y los vectores que las transmiten.

El hecho de haber observado la presencia de *Anaplasma phagocytophilum* en un lobo mexicano en la Reserva de la Biosfera de la Michilía es un punto de atención, ya que indica una falta de planeación y estrategias de conservación que se está reflejando en la transmisión de patógenos por vectores que probablemente sean exóticos en el área. La conservación del lobo mexicano es una prioridad en México, por lo que es importante seguir monitoreando su salud y vigilar el entorno para evitar en la medida de lo posible la entrada de vectores que les transmitan enfermedades y que pongan en peligro sus vidas. La siguiente pregunta que debe investigarse es cuál es el origen y desplazamiento de los vectores artrópodos causantes de estas enfermedades y su papel en la ecología y transmisión de las enfermedades zoonóticas bacterianas a lobos mexicanos.

Literatura citada

- ABARCA, V. K., LOPEZ DEL, P. J., GONZALEZ, A. P., DABANCH, P. J., TORRES, H. M., SOLARI, G. V. & PERRET, P. C. 2008. [Seroepidemiological evidence of human exposure to *Anaplasma* sp in Santiago, Chile]. *Rev Chilena Infectol*, 25, 358-61.
- ACHA, P. N. & SZYFRES, B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol I Bacteriosis y Micosis. *Organización Panamericana de la Salud. E.U.A.*
- ACHA, P. N. & SZYFRES, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Organización Panamericana de la Salud.* , Vol. III.
- AGUERO-ROSENFELD, M. E. 2003. Laboratory aspects of tick-borne diseases: lyme, human granulocytic ehrlichiosis and babesiosis. *Mt Sinai J Med*, 70, 197-206.
- AUCOTT, J. N., SEIFTER, A. & REBMAN, A. W. 2012. Probable late lyme disease: a variant manifestation of untreated *Borrelia burgdorferi* infection. *BMC Infect Dis*, 12, 173.
- BAKKEN, J. S. & DUMLER, S. 2008. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*, 22, 433-48, viii.
- BARANDIKA, J. F., HURTADO, A., GARCIA-ESTEBAN, C., GIL, H., ESCUDERO, R., BARRAL, M., JADO, I., JUSTE, R. A., ANDA, P. & GARCIA-PEREZ, A. L. 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6166-71.
- BEALL, M. J., ALLEMAN, A. R., BREITSCHWERDT, E. B., COHN, L. A., COUTO, C. G., DRYDEN, M. W., GUPTILL, L. C., IAZBIK, C., KANIA, S. A., LATHAN, P., LITTLE, S. E., ROY, A., SAYLER, K. A., STILLMAN, B. A., WELLES, E. G., WOLFSON, W. & YABSLEY, M. J. 2012. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. *Parasit Vectors*, 5, 29.
- BELTRÁN-SAAVEDRA, L. F., BELDOMENICO, P. M. & J.L., G. 2009. Estudio coproparasitológico de mamíferos silvestres en cautiverio con destino a relocación en Santa Cruz, Bolivia. *vet.zootec.* , 3.
- BENGIS, R. G., LEIGHTON, F. A., FISCHER, J. R., ARTOIS, M., MORNER, T. & TATE, C. M. 2004. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech*, 23, 497-511.
- BERENDE, A., OOSTING, M., KULLBERG, B. J., NETEA, M. G. & JOOSTEN, L. A. 2010. Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. *Eur Cytokine Netw*, 21, 7-18.
- BERNABEU-WITTEL, M. & SEGURA-PORTA, F. 2005. [Rickettsioses]. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 23, 163-72.
- BERNDTSON, K. 2013. Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *Int J Gen Med*, 6, 291-306.
- BEUGNET, F., CHALVET-MONFRAY, K. & LOUKOS, H. 2009. FleaTickRisk: a meteorological model developed to monitor and predict the activity and density of three tick species and the cat flea in Europe. *Geospat Health*, 4, 97-113.
- BLACKWELL, M. J. & LEAP, R. L. 2008. Veterinary medicine is public health. *J Vet Med Educ*, 35, 148-9.
- BLANCO, J. R., JADO, I., MARIN, M., SANFELIU, I., PORTILLO, A., ANDA, P., PONS, I. & OTEO, J. A. 2008. [Microbiological diagnosis of emerging bacterial pathogens: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, and *Tropheryma whipplei*]. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 26, 573-80.
- BLEVINS, S. M., GREENFIELD, R. A. & BRONZE, M. S. 2008. Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, and Chagas disease. *Cleve Clin J Med*, 75, 521-30.
- BOTELHO-NEVERS, E. & RAOULT, D. 2007. Fever of unknown origin due to rickettsioses. *Infect Dis Clin North Am*, 21, 997-1011, ix.

- BRETT-MAJOR, D. M. & LIPNICK, R. J. 2009. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007342.
- BROUQUI, P., BACELLAR, F., BARANTON, G., BIRTLES, R. J., BJOERSDORFF, A., BLANCO, J. R., CARUSO, G., CINCO, M., FOURNIER, P. E., FRANCAVILLA, E., JENSENIUS, M., KAZAR, J., LAFERL, H., LAKOS, A., LOTRIC FURLAN, S., MAURIN, M., OTEO, J. A., PAROLA, P., PEREZ-EID, C., PETER, O., POSTIC, D., RAOULT, D., TELLEZ, A., TSELENTIS, Y., WILSKÉ, B., ESCMID STUDY GROUP ON COXIELLA, A. R., BARTONELLA & EUROPEAN NETWORK FOR SURVEILLANCE OF TICK-BORNE, D. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 10, 1108-32.
- BUITRAGO, M. D. 2009. Epidemiología de las Rickettsiosis, Una Revisión Narrativa. Aportes para la Vigilancia Epidemiológica. *Universidad de Antioquia* 88.
- CARDOSO, L., MENDAO, C. & MADEIRA DE CARVALHO, L. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal--a national serological study. *Parasit Vectors*, 5, 62.
- CARRADE, D. D., FOLEY, J. E., BORJESSON, D. L. & SYKES, J. E. 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med*, 23, 1129-41.
- CASATI, S., BERNASCONI, M. V., GERN, L. & PIFFARETTI, J. C. 2008. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus sensu stricto* (Acari: Ixodidae). *Infect Genet Evol*, 8, 152-8.
- CHEN, S. M., DUMLER, J. S., BAKKEN, J. S. & WALKER, D. H. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 589-595.
- DABANCH, P. J. 2003. Zoonosis. *Rev Chil Infect.*, 20, S47-S51.
- DE LA FUENTE, J., V., NARANJO, F., RUIZ-FONS, U., HÖFLE, I. G., FERNÁNDEZ DE MERA, D., VILLANÚA, C., ALMAZÁN, A., TORINA, S., CARACAPPA, K. M., KOCAN & C., G. 2005. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 5, 390-401.
- DINUBILE, M. J. & LIPSKY, B. A. 2004. Complicated infections of skin and skin structures: when the infection is more than skin deep. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53.
- DONG, T., QU, Z. & ZHANG, L. 2013. Detection of *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis* in patient and mouse blood and ticks by a duplex real-time PCR assay. *PLoS One*, 8, e74796.
- DOUDIER, B., OLANO, J., PAROLA, P. & BROUQUI, P. 2010. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet Parasitol*, 167, 149-54.
- DUMLER, J. S. 2012. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 64, 13-20.
- DUMLER, J. S., MADIGAN, J. E., PUSTERLA, N. & BAKKEN, J. S. 2007. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*, 45 Suppl 1, S45-51.
- EBANI, V., VERIN, R., FRATINI, F., POLI, A. & CERRI, D. 2011. Molecular Survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. *Journal of Wildlife Diseases* 47, 699-703.
- FARIA, J. L., MUNHOZ, T. D., JOAO, C. F., VARGAS-HERNANDEZ, G., ANDRE, M. R., PEREIRA, W. A., MACHADO, R. Z. & TINUCCI-COSTA, M. 2011. *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF-alpha in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20, 71-4.
- FORBES, A. E., ZOCHOWSKI, W. J., DUBREY, S. W. & SIVAPRAKASAM, V. 2012. Leptospirosis and Weil's disease in the UK. *QJM*, 105, 1151-62.

- FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S. & ISAAC, L. 2011. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*, 73, 408-19.
- FU, Y., LAN, J., WU, X., YANG, D., ZHANG, Z., NIE, H., HOU, R., ZHANG, R., ZHENG, W., XIE, Y., YAN, N., YANG, Z., WANG, C., LUO, L., LIU, L., GU, X., WANG, S., PENG, X. & YANG, G. 2013. Identification of *Dirofilaria immitis* miRNA using illumina deep sequencing. *Vet Res*, 44, 3.
- GARRIDO, G. & ARRIBAS, A. 2008. Generalidades Sobre Los Carnívoros Del Villafranquiense Superior En Relación Con El Registro Fósil De Fonelas P-1. . *Instituto Geológico y Minero de España.*, 85-146.
- GIRSCHICK, H. J., MORBACH, H. & TAPPE, D. 2009. Treatment of Lyme borreliosis. *Arthritis Res Ther*, 11, 258.
- GUERRIER, G. & D'ORTENZIO, E. 2013. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: a systematic review. *PLoS One*, 8, e59266.
- HALFFTER, G. 1984. Las reservas de la biósfera: conservación de la naturaleza para el hombre. *Acta Zoológica Mexicana*, 5, 1-50.
- HALPERIN, J. J. 2010. Nervous system Lyme disease. *J R Coll Physicians Edinb*, 40, 248-55.
- HARTSKEERL, R. A., COLLARES-PEREIRA, M. & ELLIS, W. A. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*, 17, 494-501.
- HILDEBRANDT, A., FRANKE, J., SCHMOOCK, G., PAULIKS, K., KRA`MER, A. & STRAUBE, E. 2011. Diversity and Coexistence of Tick-Borne Pathogens in Central Germany. *Journal of Medical Entomology*, 48, 651-655.
- HUBÁLEK, Z. 2003. Emerging human infectious diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Saproponoses. *Emerging Infectious diseases* 9, 403-404.
- ILLOLDI-RANGEL, P., RIVALDI, C. L., SISSEL, B., TROUT-FRYXELL, R., GORDILLO-PÉREZ, G., RODRÍGUEZ-MORENO, A., WILLIAMSON, P., MONTIEL-PARRA, G., SÁNCHEZ-CORDERO, V. & SARKAR, S. Species distribution models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme disease in Mexico *Journal of Tropical Medicine.*, ID 959101, 10 pages.
- ISMAIL, N., BLOCH, K. C. & MCBRIDE, J. W. 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med*, 30, 261-92.
- JIN, H., WEI, F., LIU, Q. & QIAN, J. 2012. Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12, 269-74.
- JONGEJAN, F. & UILENBERG, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, S3-14.
- KAHLON, A., OJOGUN, N., RAGLAND, S. A., SEIDMAN, D., TROESE, M. J., OTTENS, A. K., MASTRONUNZIO, J. E., TRUCHAN, H. K., WALKER, N. J., BORJESSON, D. L., FIKRIG, E. & CARLYON, J. A. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an invasin that interacts with mammalian host cells via its C terminus to facilitate infection. *Infect Immun*, 81, 65-79.
- KEESING, F., HERSH, M. H., TIBBETTS, M., MCHENRY, D. J., DUERR, S., BRUNNER, J., KILLILEA, M., LOGIUDICE, K., SCHMIDT, K. A. & OSTFELD, R. S. 2012. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 2013-2016.
- LESCHNIK, M., KIRTZ, G., VIRANYI, Z., WILLE-PIAZZAI, W. & DUSCHER, G. 2012a. Acute granulocytic anaplasmosis in a captive timber wolf (*Canis lupus occidentalis*). *J Zoo Wildl Med*, 43, 645-8.
- LESCHNIK, M., KIRTZ G., D. V. M., VIRANYI Z., W., W.-P. & G., D. 2012b. Acute granulocytic anaplasmosis in a captive timber wolf (*Canis lupus occidentalis*). . *American Association of Zoo Veterinarians. Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43, 645-648.

- LICHT, S., MILLSPAUGH, J., KUNKEL, E., KOCHANNY, O. & PETERSON, O. 2010. Using Small Populations of Wolves for Ecosystem Restoration and Stewardship. *BioScience*, 60, 147-153.
- LYNDA, A. & JOHN, A. 2006. CARNIVORE OCCURRENCE ALONG AN URBAN–RURAL GRADIENT: A LANDSCAPE-LEVEL ANALYSIS. *Journal of Mammalogy*, 87, 1154-1164.
- M'GHIRBI, Y., YAICH, H., GHORBEL, A. & BOUATTOUR, A. 2012. Anaplasma phagocytophilum in horses and ticks in Tunisia. *Parasit Vectors*, 5, 180.
- MANNA, L., ALBERTI, A., PAVONE, L. M., SCIBELLI, A., STAIANO, N. & GRAVINO, A. E. 2004. First molecular characterization of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a dog in South Italy. *Vet J*, 167, 224-7.
- MARSILIO, F., DI MARTINO, B., MERIDIANI, I. & BIANCIARDI, P. 2006. Direct identification of Ehrlichia canis by a novel polymerase chain reaction method and molecular analysis of the citrate synthase (gltA) gene from various Italian strains. *J Vet Diagn Invest*, 18, 215-7.
- MARTÍNEZ-MORENO F.J., HERNÁNDEZ, S., LÓPEZ-COBOS, E., BECERRA, C., ACOSTA, I. & MARTÍNEZ-MORENO, A. 2007. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology* 143.
- MARTINEZ, M. C., GUTIERREZ, C. N., MONGER, F., RUIZ, J., WATTS, A., MIJARES, V. M., ROJAS, M. G. & TRIANA-ALONSO, F. J. 2008. Ehrlichia chaffeensis in child, Venezuela. *Emerg Infect Dis*, 14, 519-20.
- MCBRIDE, J. W. & WALKER, D. H. 2010. Progress and obstacles in vaccine development for the ehrlichioses. *Expert Rev Vaccines*, 9, 1071-82.
- MCGINLEY-SMITH, D. E. & TSAO, S. S. 2003. Dermatoses from ticks. *J Am Acad Dermatol*, 49, 363-92; quiz 393-6.
- MOCTEZUMA, O., GALLO, J. P. & SERVÍN, J. 2004. ¿Podrá volver el lobo mexicano?. *Especies. Revista sobre Conservación y Biodiversidad.*, 13, 4-11.
- MOHAN KUMAR, D., YAMAGUCHI, M., MIURA, K., LIN, M., LOS, M., COY, J. F. & RIKIHISA, Y. 2013. Ehrlichia chaffeensis uses its surface protein EtpE to bind GPI-anchored protein DNase X and trigger entry into mammalian cells. *PLoS Pathog*, 9, e1003666.
- MONAHAN, A. M., CALLANAN, J. J. & NALLY, J. E. 2009a. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol*, 46, 792-9.
- MONAHAN, A. M., MILLER, I. S. & NALLY, J. E. 2009b. Leptospirosis: risks during recreational activities. *J Appl Microbiol*, 107, 707-16.
- MORCHON, R., CARRETON, E., GONZALEZ-MIGUEL, J. & MELLADO-HERNANDEZ, I. 2012. Heartworm Disease (Dirofilaria immitis) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Front Physiol*, 3, 196.
- MUFFLY, T., MCCORMICK, T. C., COOK, C. & WALL, J. 2008. Human granulocytic ehrlichiosis complicating early pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2008, 359172.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S. & PFALLE, M. A. 2012. Medical Microbiology,. *Seventh edition, Elsevier Saunders*.
- NARAYANAVARI, S. A., SRITHARAN, M., HAAKE, D. A. & MATSUNAGA, J. 2012. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). *Microbiology*, 158, 1137-46.
- OJOGUN, N., KAHLON, A., RAGLAND, S. A., TROESE, M. J., MASTRONUNZIO, J. E., WALKER, N. J., VIEBROCK, L., THOMAS, R. J., BORJESSON, D. L., FIKRIG, E. & CARLYON, J. A. 2012. Anaplasma phagocytophilum outer membrane protein A interacts with sialylated glycoproteins to promote infection of mammalian host cells. *Infect Immun*, 80, 3748-60.
- OLANO, J. P., HOGREFE, W., SEATON, B. & WALKER, D. H. 2003. Clinical manifestations, epidemiology, and laboratory diagnosis of human monocytotropic ehrlichiosis in a commercial laboratory setting. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 891-6.

- ORTEGA-ALVARES, R. & MCGREGOR-FORS, I. 2013. Ecología urbana: Experiencia en América latina. *Inecol*, Primera edición, 130.
- OTEO, J. A. & BROUQUI, P. 2005a. [Ehrlichiosis and human anaplasmosis.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 23, 375-80.
- OTEO, J. A. & BROUQUI, P. 2005b. [Ehrlichiosis and human anaplasmosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 23, 375-80.
- OTRANTO, D., BRIANTI, E., GAGLIO, G., DANTAS-TORRES, F., AZZARO, S. & GIANNETTO, S. 2011. Human ocular infection with *Dirofilaria repens* (Railliet and Henry, 1911) in an area endemic for canine dirofilariasis. *Am J Trop Med Hyg*, 84, 1002-4.
- PADDOCK, C. D. & CHILDS, J. E. 2003. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 16, 37-64.
- PAGES, F., FAULDE, M., ORLANDI-PRADINES, E. & PAROLA, P. 2010. The past and present threat of vector-borne diseases in deployed troops. *Clin Microbiol Infect*, 16, 209-24.
- PAROLA, P., DAVOUST, B. & RAOULT, D. 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*, 36, 469-92.
- PATZ, J. A., DASZAK, P., TABOR, G. M., AGUIRRE, A. A., PEARL, M., EPSTEIN, J., WOLFE, N. D., KILPATRICK, A. M., FOUFOPOULOS, J., MOLYNEUX, D. H. & BRADLEY, D. J. 2004. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives* 112, 1092-1098.
- REJMANEK, D., FOLEY, P., BARBET, A. & FOLEY, J. 2012. Evolution of antigen variation in the tick-borne pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Mol Biol Evol*, 29, 391-400.
- RIKIHISA, Y. 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev*, 24, 469-89.
- ROCA, B. 2006. Leptospirosis. *REV MED UNIV NAVARRA*, 50, 3-6.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. & COB-GALERA, L. A. 2001. Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria. *Universidad Autónoma de Yucatán*, Segunda edición., 306.
- ROTONDANO, T. E., DE ALMEIDA, A. M., LUSTOSA, E. M., CORDEIRO, A. A., CAMBOIM, E. K., DE AZEVEDO, S. S., DE ANDRADE, P. P. & DE MELO, M. A. 2012. An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. *ScientificWorldJournal*, 2012, 605743.
- SCOTT, D., FERNANDO, K., DURDEN, A. & MORSHED, M. G. 2004. Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, Endemic in Epicenter at Turkey Point, Ontario. *J. Med. Entomol.*, 41(2).
- SCHMIDT, L. H., DIRKSEN, U., REITER-OWONA, I., KHURANA, C., WIEBE, K., WIEWRODT, R. & SPIEKER, T. 2011. Pulmonary dirofilariasis in a Caucasian patient with metastasised osteosarcoma in a non-endemic European region. *Thorax*, 66, 270.
- SEMARNAT 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. . *NOM-059-SEMARNAT*.
- SERVÍN, J. 1997. El periodo de apareamiento, nacimiento y crecimiento del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*). *Acta zoologica mexicana.* , 071, 44-56.
- SERVÍN MARTÍNEZ, J. I. 2007. Distribución histórica, prospección actual y áreas potenciales para reintroducir lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en Durango, sur de la Sierra Madre Occidental, México. Universidad Juárez del Estado de Durango. Informe final. *SNIB-CONABIO*, proyecto No. BE029. México D.
- SHIMSHONY, A. 2008. Zoonoses transmitted by cats highlight importance of proper care. . *Infectious Disease News* 21, 9-12.

- SIDOTI, E. & TRINGALI, G. 2009. Ehrlichioses and anaplasmoses: (re)emerging tickborne zoonoses in humans and in animals. *J Prev Med Hyg*, 50, 9-18.
- SIMON, F., SILES-LUCAS, M., MORCHON, R., GONZALEZ-MIGUEL, J., MELLADO, I., CARRETON, E. & MONTOYA-ALONSO, J. A. 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev*, 25, 507-44.
- ST CLAIR, K. & DECKER, C. F. 2012. Ehrlichioses: anaplasmosis and human ehrlichiosis. *Dis Mon*, 58, 346-54.
- SUAREZ, R., NIÑO, N., GONZÁLEZ, C., FERNANDO, J., OREJUELA, L., SÁNCHEZ, R., CASTAÑEDA, E. & VALBUENA, G. 2008. Las Rickettsias como agentes etiológicos de entidades febriles no diagnosticadas en Colombia, Bogotá. *Universidad de Los Andes, Departamento de Antropología*, 1 ed., 96.
- SUSAN, A. G. 2000. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de la fauna silvestre. *Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México*.
- TARELLO, W. 2011. Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990-2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *J Parasitol Res*, 2011, 578385.
- TIQUE, S. P., MATTAR, S., RIOS, R., FRANCO, Z. & URREA, M. 2008. "Seroprevalencia de *Leptospira* sp *Rickettsia* sp. y *Ehrlichia* sp. en trabajadores rurales del departamento de Sucre, Colombia". En: Colombia : *Colombia Infectio*, 318-323.
- TORINA, A., ALONGI, A., SCIMECA, S., VICENTE, J., CARACAPPA, S. & DE LA FUENTE, J. 2010. Prevalence of tick-borne pathogens in ticks in Sicily. *Transbound Emerg Dis*, 57, 46-8.
- TRUONG, K. N. & COBURN, J. 2011. The emergence of severe pulmonary hemorrhagic leptospirosis: questions to consider. *Front Cell Infect Microbiol*, 1, 24.
- TSAO, J. I. 2009. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet Res*, 40, 36.
- ULRICH, L. E. & ZHULIN, I. B. 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res*, 38, D401-7.
- UNVERA, A., RIKIHISA, Y., KARAMAN, M. & OZEN, H. 2009. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2, 59-61.
- VALLAT, B. 2009. Critical questions for veterinary education on global veterinary public health. *Rev Sci Tech*, 28, 439-50.
- VIEIRA, R. F., VIEIRA, T. S., NASCIMENTO DDO, A., MARTINS, T. F., KRAWCZAK, F. S., LABRUNA, M. B., CHANDRASHEKAR, R., MARCONDES, M., BIONDO, A. W. & VIDOTTO, O. 2013. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 55, 335-40.
- WOLDEHIWET, Z. & 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*, 167, 108-122.
- WU, X. B., NA, R. H., WEI, S. S., ZHU, J. S. & PENG, H. J. 2013. Distribution of tick-borne diseases in China. *Parasit Vectors*, 6, 119.
- YABSLEY, M. J. 2010. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis*: vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. *Vet Parasitol*, 167, 136-48.