

Diagnóstico Molecular de Efermedades Bacterianas Transmitidas por Garrapatas

**Reunión Naciona de Líderes del
Programa de Zoonosis 2016**

**Hotel Araiza Palmira
La Paz, BCS, México
4 de Julio de 2016.**



RICKETTSIOSIS

**TEXAS A&M
AGRILIFE
RESEARCH**



**TEXAS A&M
UNIVERSITY**

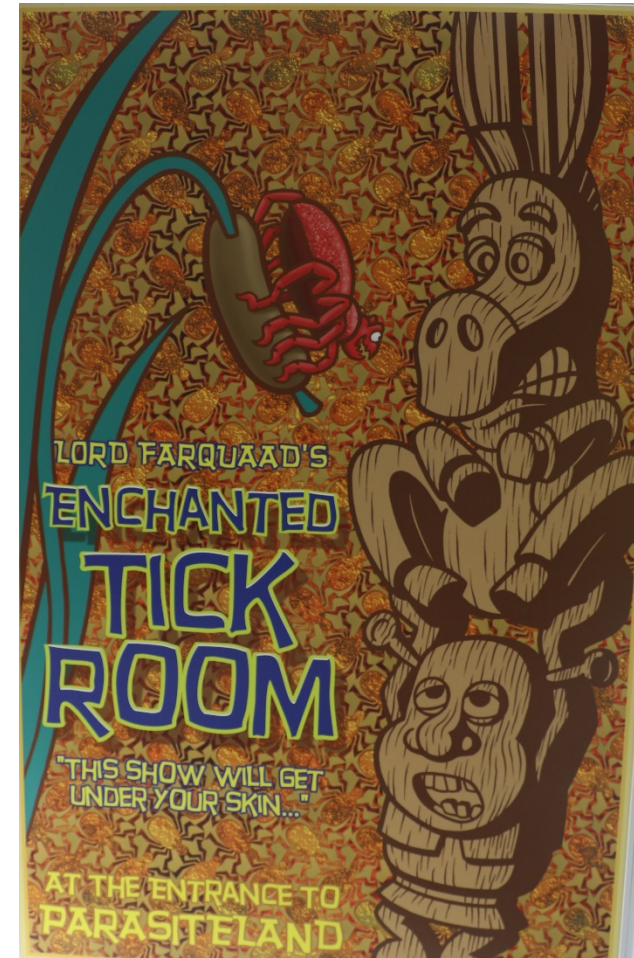
**VETERINARY MEDICINE
& BIOMEDICAL SCIENCES**

**MVZ Luis Lecuona
USDA/APHIS/WS-IS Mexico.
luis.lecuona@aphis.usda.gov**

Diagnosticando garrapatas en animales

Desarrollo del PCR Multiplex para la detección de:

- **Borrelia burgdorferi**
- **Ehrlichia canis**
- **E. chaffeensis**
- **Anaplasma phagocytophilum**
- **Rickettsia rickettsii**



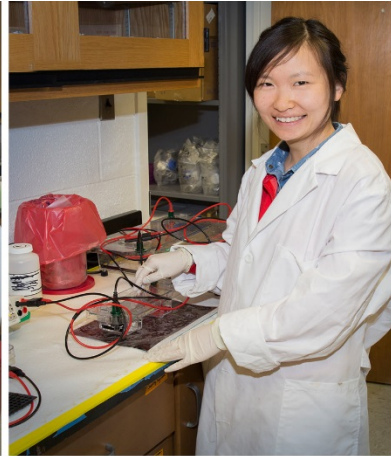
Equipo de Diagnóstico de TA&M



Abha Grover
Lab Tech (India)



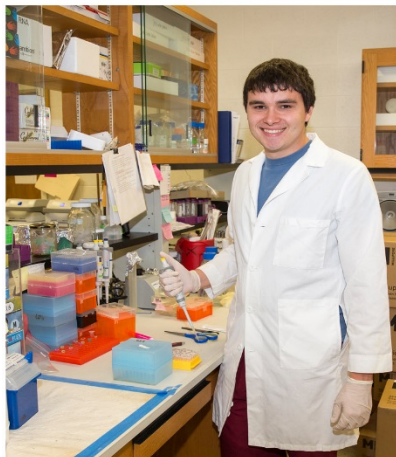
Eman Abuelhasan VM
Visiting Scholar (Egypt)



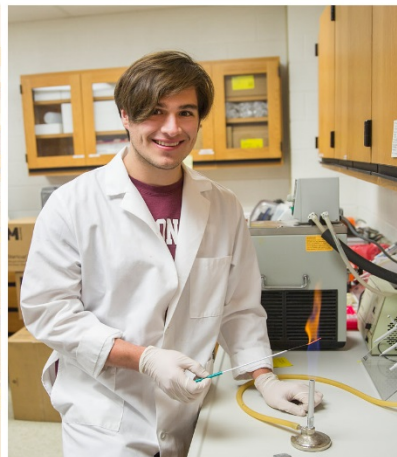
Jiannan Liu
Visiting Scholar (China)



Ross Wittenborn
Undergraduate student (US)



Robert Chouffot
Undergraduate student (US)



Branden Nettles
Undergraduate scholar (US)



Shakirat Adetunji
MS student (Nigeria)



Christina Small
PhD student (US)

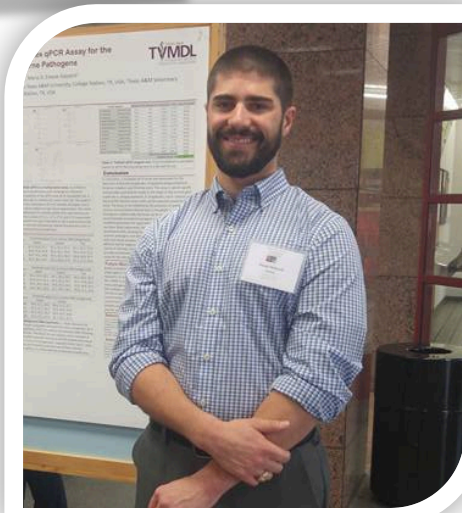
Equipo de Diagnóstico de TA&M



Undergraduate research team:
Brian, Annie, Thomas and Brittany



Jaqueline: visiting scholar (BZ)
Mackenzie: PhD student



Joseph: PhD student and TVMDL
Fulltime employee

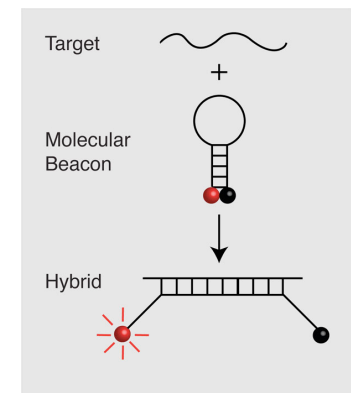
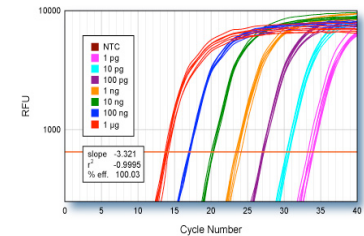
Equipo de Diagnóstico de TA&M



Dra. Ma. Dolores Esteve – Gassent
Assistant Professor

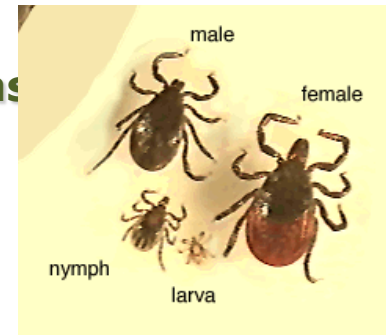
Objetivo del Estudio

- Desarrollo de la técnica Multiplex PCR
- Detección de Multi-patógenos
- Compatible con el Secuenciamiento
- Confirmación de Especies
- Epidemiología Molecular
- Compatible con Plataformas de diagnóstico
- PCR en Tiempo Real
- Modelo Molecular de Tecnología PCR
- Otras ventajas



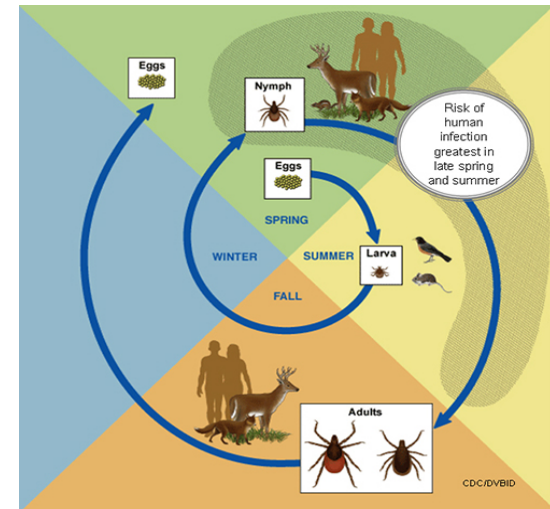
Enfermedad de Lyme

- **Artrópodo las importante en EUA**
- **Más de 30,000 casos por año (CDC)**
- **Transmitida por Garrapata de Patas Negras**
***Ixodes scapularis* y *I. pacificus* (EUA)**
- **Reservorios: Mamíferos menores y**
pequeños roedores
- **Causada por *Borrelia burgdorferi***
(Espiroqueta)
- **Cuadro multifasico en humanos**
- **Cuadro temprano (70% de Eritema)**
- **Diseminación temprana (Cuadro gripal)**
- **Cuadro Crónico (Artritis y carditis)**



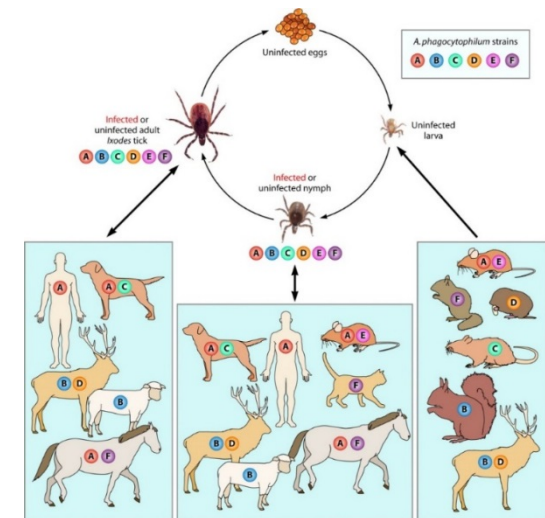
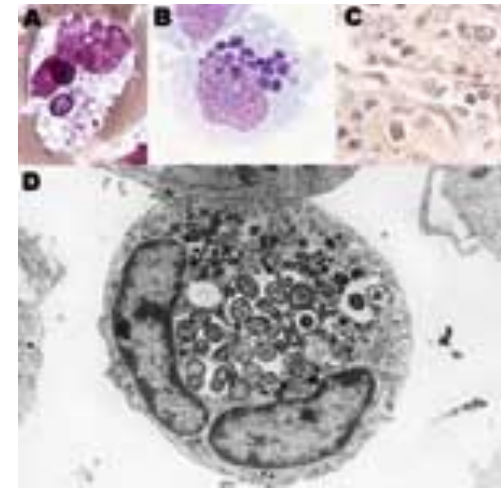
Ehrlichiosis

- Bacteria Pequeña
- Gram Negativa
- Forma Elipsoidal
- Sintomatología inespecífica
 - Fiebre
 - Dolor de Cabeza
 - Fatiga
 - Dolor Muscular
- Los síntomas ocurren de 1 a 2 semanas después de la mordedura de la garrapata



Anaplasma phagocytophilum

- Bacteria Gram negativa e intracelular
- Ataca Neutrófilos (acúmulos y vacuolas)
- Altera su función en el Huésped
- Fiebre y Decaimiento
- Dolor de Cabeza, Muscular y Abdominal
- Escalofrío, Nausea, Tos y Confusión
- Diversas presentaciones clínicas
- Dificultad para respirar
- Hemorragia
- Falla renal
- Problemas neurológicos



Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas

- **Rickettsia rickettsii**
- **Bacteria Gram negativa, intracelular, tipo cocobacilo**
- **Fiebre**
- **Letargo**
- **Dolor abdominal y muscular**
- **Vómito**
- **Eritema en el 90% de los pacientes**
- **Ocurre entre 2-5 días después de la fiebre**
- **Maculas rosas pequeñas y planas**
- **Partes distales de las extremidades**
- **Varían con el tiempo**



Primer Foro (2015)

- **Tijuana (Mayo/2015)**
- **Factibilidad de colaborar en diagnóstico**
- **Rhipicephalus sanguinus de Baja California Sur**
- **Asociados a perros donde hubo casos en humanos**
- **Se enviaron muestras de garrapatas a UTSA**
- **Se corrieron pruebas mediante Metodología qPCR**



Foro para la atención integral de la Rickettsiosis en la frontera Norte de México

27 al 29 de mayo de 2015



Tijuana, Baja California

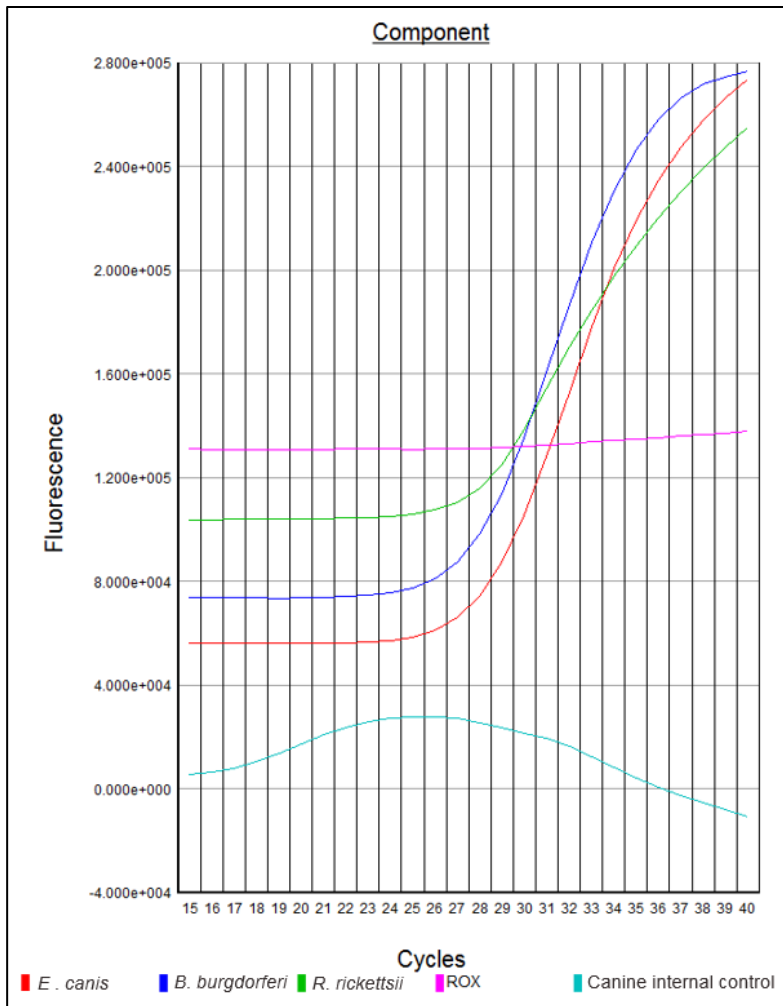
Sensibilidad - qPCR

<i>Borrelia burgdorferi</i>			<i>Rickettsia rickettsii</i>			<i>Anaplasma phagocytophilum</i>			<i>Ehrlichia canis</i>		
DNA ng/μl	Mean C _t	Copy Number	DNA ng/μl	Mean C _t	Copy Number	DNA ng/μl	Mean C _t	Copy Number	DNA ng/μl	Mean C _t	Copy Number
4.95	N/A	1.05E+09	4.95	N/A	1.05E+09	4.97	N/A	6.90E+09	4.97	N/A	6.90E+09
4.95E-07	28.6	840	4.95E-07	27.7	840	4.97E-06	25.4	6900	4.97E-06	25.1	6900
1.24E-07	30.6	210	1.24E-07	29.8	210	4.97E-07	28.8	690	4.97E-07	28.6	690
3.09E-08	32.8	53	3.09E-08	32.0	53	4.97E-08	32.1	69	4.97E-08	31.6	69
7.73E-09	34.2	13.13	7.73E-09	33.8	13.13	1.24E-08	34.3	17.20	1.24E-08	34.0	17.20
3.87E-09	35.9	6.56	3.87E-09	35.0	6.56	3.11E-09	36.1	4.31	3.11E-09	36.4	4.31*
1.93E-09	37.6	3.28*	1.93E-09	36.8	3.28*	1.55E-09	37.2	2.16*	1.55E-09	39.1	2.16
4.83E-10	0.0	<1	4.83E-10	37.7	<1	7.77E-10	0.0	<1	7.77E-10	0.0	<1

Especificidad - qPCR

Substrates	<i>B. burgdorferi</i> qPCR C _t	<i>A. phagocytophilum</i> qPCR C _t	<i>R. rickettsii</i> qPCR C _t	<i>E. Canis</i> qPCR C _t	<i>E. Chaffeensis</i> qPCR C _t
<i>B. burgdorferi</i>	30.1	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>A. phagocytophilum</i>	0.0	25.1	0.0	0.0	0.0
<i>R. rickettsii</i>	0.0	0.0	27.3	0.0	0.0
<i>E. canis</i>	0.0	0.0	0.0	27.0	0.0
<i>E. chaffeensis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	26.2
<i>Babesia canis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>B. gibsoni</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>A. marginale</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>R. typhi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Control Interno Canino



Specific to	Validated Against
<i>Canis lupus familiaris</i>	Equine
<i>Canis lupus</i>	Feline
<i>Canis latrans</i>	Caprine
	Ovine
	Cervine
	Bovine
	Porcine
	Avian
	Procyonine
	Vulpine
	Mephitidae

Muestras de Baja California Sur

- Se evaluaron 211 muestras de *R. sanguineus*
- Se colectaron de perros en 160 puntos ambientales
- Muestras procesadas para:
 - Confirmar las especies de garrapatas
 - Sexo
 - Edad
 - Detección de patógenos

**Todos los experimentos se realizaron el
Texas A&M Veterinary Medical Diagnostic Lab (TVMDL)**

Resultados



Resumen Ejecutivo: Estudio de Vigilancia epidemiológica de Garrapatas Colectadas en Baja California Mayo 2016

Antecedentes

A través de la reunión de Rickettsiosis organizada por la Secretaría de Salud el pasado Mayo 2015 en Tijuana, Baja California, se acordó que mi laboratorio analizaría una serie de muestras de garrapatas colectadas en Baja California. Este análisis se realizó con el objetivo de determinar la prevalencia de garrapatas infectadas con el agente causante de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (*Rickettsia rickettsii*). De la misma forma se evaluó la presencia de otros agentes infecciosos como son los patógenos responsables de la enfermedad de Lyme, las Ehrlichiosis y las Anaplasmosis.

En el resumen ejecutivo aquí presente les informamos sobre los análisis realizados, así como los resultados obtenidos y la consecuente relevancia en salud pública.

Metodología

Un total de 211 garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* fueron analizadas en este estudio. Dichas garrapatas fueron colectadas de un total de 160 perros, así como de los habitáculos de los mismos (casas). Todas las muestras proceden de La Paz, Baja California.

Una vez identificadas, las garrapatas fueron procesadas para la obtención del ADN y posterior detección de *R. rickettsii*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* y el género *Babesia* spp. Se utilizó una técnica Multiplex de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) desarrollada en los laboratorios de la Dra. María D. Esteve-Gassent y el laboratorio de diagnóstico de Texas A&M Veterinary Medical Diagnostic Laboratory (TVMDL). Todas las muestras se procesaron siguiendo protocolos estandarizados por el laboratorio de diagnóstico de referencia, para asegurar la integridad de las muestras y evitar posibles contaminaciones. Por lo tanto, las extracciones de ADN, PCR y análisis de resultados se realizaron en laboratorios diferentes siguiendo los protocolos de diagnóstico.

Conclusiones

Tras el análisis realizado por nuestro laboratorio, podemos concluir que *R. rickettsii* está presente en garrapatas de la especie *R. sanguineus* colectadas de perros y viviendas de La Paz, Baja California México. Además, gracias a la campaña de Rickettsiosis liderada por la Secretaría de Salud, hemos podido detectar la presencia de *Ehrlichia canis*, otro agente infeccioso con carácter zoonótico, perteneciente a la familia bacteriana de las Rickettsiales, que podría estar causando parte de las infecciones observadas en perros y en humanos de la región estudiada.

Este equipo de investigación recomienda un programa de vigilancia epidemiológica en la que se evalúe la presencia de ambos patógenos zoonóticos en garrapatas presentes en perros, sus habitáculos, así como en animales de vida silvestre incluyendo roedores.

María D. Esteve-Gassent, PhD

Texas A&M University
Department of Veterinary Pathobiology,
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences

VMA Room 316
4467-TAMU
College Station, TX 77843-4467
Tel. 979.845.1117 Lab. 979.845.4596

MEsteve-Gassent@cvm.tamu.edu
<http://vetmed.tamu.edu/igps/lyme-lab>

Resultados

Como se observa en la tabla 1, el 0.9% de las garrapatas muestreadas fueron positivas para *R. rickettsii*, y el 8.5% fueron positivas para *E. canis*, constituyendo un total del 9.5% de infección independientemente de la bacteria testada. Por otro lado el test fue negativo para *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* y *E. canis*.

Tabla 1: resumen de los resultados obtenidos por la reacción Multiplex de PCR cuantitativa a tiempo Real. Se testaron un total de 211 garrapatas de la especie *R. sanguineus*.

Patógenos	Positivos (%)*
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0
<i>Ehrlichia canis</i>	18 (8.5)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	0
<i>Rickettsia rickettsii</i>	2 (0.9%)
<i>Babesia</i> spp.	0
Total	20 (9.5%)

* resultados fueron confirmados por secuenciación.

Índice

- 1 Metodología, resultados obtenidos y Conclusiones
- 2 Dirección y Contacto

Resultados

Tabla 1: resumen de los resultados obtenidos por la reacción Multiplex de PCR cuantitativa a tiempo Real. Se testaron un total de 211 garrapatas de la especie *R. sanguineus*.

Patógenos	Positivos (%)*
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0
<i>Ehrlichia canis</i>	18 (8.5)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	0
<i>Rickettsia rickettsii</i>	2 (0.9%)
<i>Babesia</i> spp.	
Total	20 (9.5%)

* resultados fueron confirmados por secuenciación.

iGracias!



Luis Lecuona, DVM
Agricultural Specialist in Animal Health
USDA/APHIS/IS-WS Mexico
Luis.Lecuona@aphis.usda.gov