

Artículo original

Caracterización del Primer Caso de Infección Humana por Ehrlichia canis en Panamá Characterization of the First Case of Human Infection by Ehrlichia canis in Panama

*Daza T. Carlos, **Osorio Julio, ***Santamaría Ana María, ***Suárez José Antonio, **Hurtado Amílcar, ***Bermúdez Sergio.

*Hospital Materno Infantil José Domingo De Obaldía, David, Chiriquí, Panamá. **Hospital Regional Rafael Hernández, Chiriquí, Panamá. ***Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá.

Palabras claves:

Ehrlichia canis, ehrlichiosis humana, infección severa, diagnóstico diferencial, Panamá.

Keywords:

Ehrlichia canis, human ehrlichiosis, severe infection, differential diagnosis, Panama.

Correspondencia a:

Carlos Alberto Daza

Timaná. Email: carlo-

sadazat@gmail.com

Sergio Bermúdez C.

E-mail: sbermu-

dez@gorgas.gob.pa

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de intereses reales o potenciales.

Resumen

Ehrlichia canis fue considerada un patógeno exclusivo de caninos y tiene como su principal vector a garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Diversos estudios de casos demuestran que también puede producir patología en humanos, de las que hasta el momento sólo se han asociado a infecciones asintomáticas y de leve a moderada intensidad. El objetivo de este manuscrito es describir la presentación clínica de un caso severo de ehrlichiosis en un joven inmunocompetente y presentar el diagnóstico diferencial de *E. canis*. La determinación del agente etiológico se realizó por medio de pruebas serológicas (IFI) y moleculares (gltA, ompA, 16S rARN, ECC, ECB, Dsb-330 y Dsb-728) a muestras de sangre del paciente. No se obtuvieron resultados para pruebas serológicas contra dengue, hantavirus, HIV, Leptospira, tampoco dio resultado el PCR de parainfluenza (1, 2, 3), adenovirus, influenza (A y B) y rinovirus. Los resultados para Rickettsia demostraron sero-reacción IgG, pero no IgM ni para los análisis moleculares. Secuencias de los segmentos amplificados mostraron un 99% de homología con *E. canis* para el gen 16S rARN y de 100% el gen dsb. Este es el primer caso confirmado y descrito de infección de *E. canis* en un paciente inmunocompetente humano en Panamá.

Abstract

Ehrlichia canis was considered an exclusive canine pathogen and its main vector is ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. Several case studies show that it can also cause pathology in humans, which until now have only been associated with asymptomatic infections and mild to moderate intensity. The aim of this paper is describe the clinical presentation of a severe case of ehrlichiosis, an immuno-competent young man. Present the differential diagnosis of *Ehrlichia canis*. The determination of the etiological agent, serological (IFA) and molecular tests (gltA, ompA, 16S rRNA, ECC, ECB, Dsb-330 and Dsb-728) were performed on patient blood samples. No results were obtained for serological tests against dengue, hantavirus, HIV, Leptospira, nor on PCR for parainfluenza (1, 2, 3), adenovirus, influenza (A and B), and rhinovirus. The results for Rickettsia demonstrated sero-reaction IgG, but not IgM nor for molecular analyzes. Sequences of the amplified segments showed 99% homology with *E. canis* for the 16S rRNA gene and 100% for the dsb gene. This is the first confirmed and described case of *E. canis* infection in a human immunocompetent patient in Panama.

INTRODUCCIÓN

Ehrlichia canis es una bacteria del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceas, y que está considerada como uno de los patógenos más importantes en medicina veterinaria. Esta especie es la causante de la ehrlichiosis monocítica canina, la cual es transmitida a los perros por medio de las picadas de garrapatas [1,2]. Los primeros reportes de esta enfermedad datan de los años 30 cuando se caracterizaron perros enfermos de África [3]. Décadas más tarde los reportes se extendieron a diferentes

regiones tropicales y subtropicales del mundo, como consecuencia de la amplia distribución de las garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*, las cuales son su principal vector [4]. A pesar de que *E. canis* afecta perros, se han descrito infecciones asintomáticas y sintomáticas en personas de Venezuela y México, además de detectarse en bancos de sangre en Costa Rica [5-8]. El periodo de incubación de *E. canis* en perros es de 10 a 14 días, luego de este periodo se presentan síntomas agudos que pueden incluir fiebre, depresión, anorexia, anemia, diarrea, petequias, linfadenopatía y trombocitopenia. Por lo general, esta fase es seguida por una cróni-

Tabla 1. Evolución de los laboratorios durante su estancia en la UCI.

Valores de Laboratorio	Valores normales	1 día UCI	2 día UCI	4 día UCI	5 día UCI	6 día UCI	7 día UCI
Leucocitos	4,5-11,5K/uL	7,1	14,9	27,5	30,2	19,2	19,4
Neutrófilos	50-70%	91	93	84	77	78	78
Linfocitos	18-70%	5	3	6	10	12	12
Hemoglobina	14-18g/dL	12	13	13,3	13	10,2	9,5
Hematocrito	40-54%	32	35	36	36	28	26
Plaquetas	150-450K/uL	101	45	20	41	32	71
Proteína C reactiva	38-174 mg/dL	27,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Velocidad de sedimentación globular	0-20 mm/h	11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ALT	10-38U/L	119	N.D.	N.D.	166	N.D.	N.D.
AST	10-41 U/L	63	170	91	80	75	N.D.
Fosfatasa alcalina	40-129 U/L	N.D.	N.D.	N.D.	232	N.D.	N.D.
Albumina	3,4-4,8 g/dL	2,7			1,7		
Sodio	136-145 mEq/L	137	133	129	126	130	136
Potasio	3,5-5,1 mEq/L	3,5	4,3	4,5	4,5	3,8	3,7
Creatininquinasa	8,4-9,7U/L	470	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C3	85-193mg/dL	N.D.	N.D.	N.D.	64,7	N.D.	N.D.
C4	12-36mg/dL	N.D.	N.D.	N.D.	33,5	N.D.	N.D.
Ig E	14-300 U/mL	N.D.	N.D.	N.D.	79	N.D.	N.D.
Ig G	23-1685 mg/dL	N.D.	N.D.	N.D.	593	N.D.	N.D.
Ig A	69-382 mg/dL	N.D.	N.D.	N.D.	150	N.D.	N.D.
Ig M	63-277 mg/dL	N.D.	N.D.	N.D.	61,6	N.D.	N.D.
VIH		Negativo					
VDR		No reactor					

ca caracterizada por pancitopenia, síntomas neurológicos, hipoplasia de médula ósea, lo que generalmente desencadena la muerte en el animal [9,10]. Con algunas diferencias estos síntomas y signos no específicos pueden presentarse en humanos, por lo que se enmascaran con enfermedades de mayor prevalencia como el dengue, la malaria o la leptospirosis, además de ser similares a otras enfermedades transmitidas por garrapatas como las rickettsiosis o la ehrlichiosis humana (causadas por *Ehrlichia chaffeensis*). Contrastando con elevada mortandad en perros, hasta el momento no existen reportes de muertes humanas provocadas por esta enfermedad [5-8].

En Panamá la fiebre manchada producida por *Rickettsia rickettsii* es la única enfermedad rickettsial comprobada en humanos [11-16]; mientras que las anaplasmatosis (*Anaplasma platys*) y ehrlichiosis (*E. canis*) son comúnmente reportadas en perros [11,17]. En este país *R. rickettsii*, *Rickettsia amblyommatis* y *E. canis*, han sido detectadas en *R. sanguineus* s.l., tanto en zonas urbanas como rurales [18, 19]. Esta especie es altamente nidícola y sobrevive dentro de residencias humanas, aun así, el parasitismo en personas es poco frecuente en Panamá [20] y hasta el momento no se ha confirmado ningún caso de infección humana por *E. canis*. De hecho, la única referencia de esta especie como posible transmisor de enfermedades a humanos en Panamá fue recientemente documentada por un caso fatal de fiebre manchada por *R. rickettsii* en un área urbana [19]. En este trabajo se presenta la descripción clínica de un adolescente inmunocompetente en quien se le documentó una infección severa por *E. canis*.

Descripción del caso

El 5 de diciembre del 2013 un adolescente de 14 años fue atendido ambulatoriamente en un centro hospitalario

de la ciudad de David (provincia de Chiriquí, Panamá), al presentar fiebre, malestar general y una escara en la región infra clavicular izquierda acompañada de una adenopatía axilar ipsilateral. El paciente fue manejado con penicilina G 1.2 millones de unidades intramuscular cada día, durante tres días, sin presentar mejoría al transcurso de ese tiempo. Al cuarto día de inicio de síntomas la fiebre se incrementó a 39° C, acompañada de cefalea intensa y mialgias, por lo que se administró con ceftriaxone intramuscular 1 gr cada día y levofloxacina oral 500 mg por día. 48 horas después regresó a urgencias, adicionando otros síntomas: hiperemia conjuntival, orinas colúricas, además de erupción maculo papular en cuello y tórax, que palidecía a la digito presión.

Se indicó cargas de hidratación de solución salina normal a 20 cc por Kg dos cargas y terapia antibiótica intravenosa con cefepima 2 gr IV cada 8 horas y vancomicina 20 mg por Kg cada 8 horas.

Once días posteriores al primer contacto médico es ingresado a la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Regional Rafael Hernández (UCI-HRRH), con diagnóstico de sepsis asociado a infección de tejidos blandos y una posible endocarditis bacteriana. A su ingreso presentaba mialgias, somnolencia, hipotensión (83/39 mm-Hg), eritema perilesional de 1 cm, hiperemia conjuntival, eritema papular generalizado, petequias aisladas, tiraje intercostal, taquicardia con soplo de mitral III/VI.

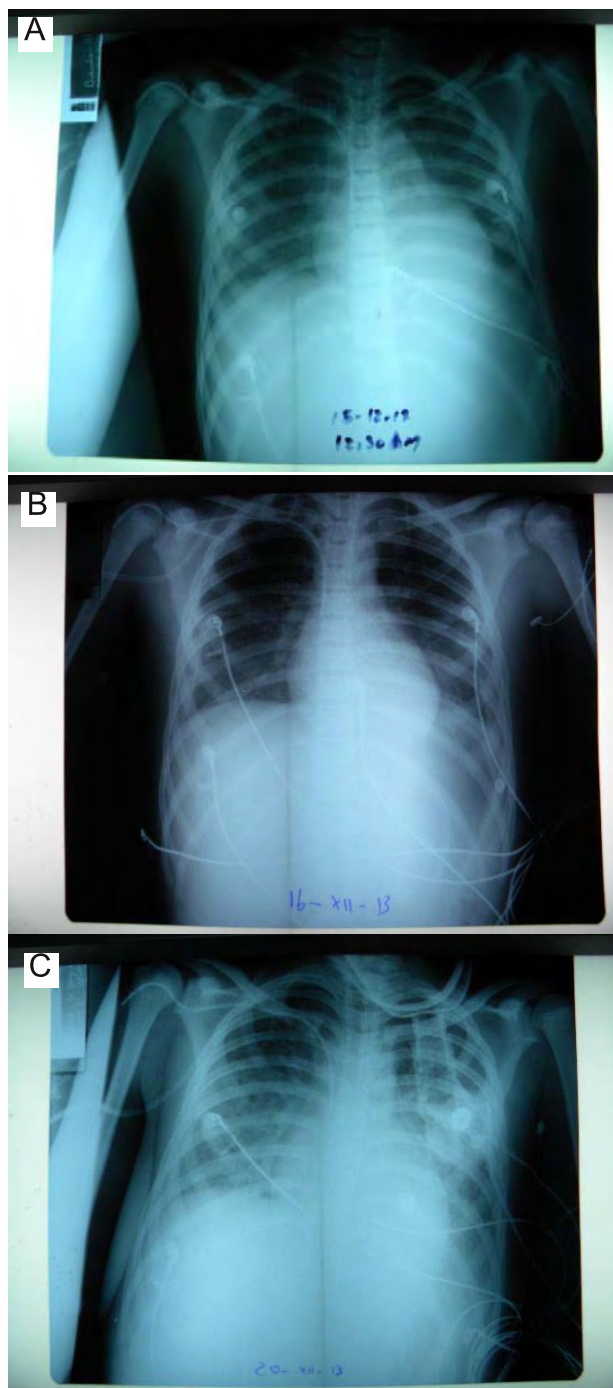
Los exámenes paraclínicos revelaban leve trombocitopenia (101 K/uL), moderada elevación de funciones hepáticas (aspartato alanino transferasa 119 U/L y aspartato amino transferasa 63 U/L), hiponatremia (133 mEq/L), escasa respuesta inflamatoria (velocidad de eritrosedimentación de 11 mm/h) y una moderada elevación de la creatinina fosfoquinasa (470 U/L) (Ver Tabla 1).

El paciente fue tratado por 72 horas con levofloxaxina IV (500 mg por día), vancomicina IV (60 mg/Kg/ día) y gentamicina IV (5 mg/Kg/día), sin presentar mejoría. Las pruebas serológicas para dengue, hantavirus, HIV, *Lep-tospira* resultaron negativas, así como los PCR para parainfluenza 1, 2, 3, adenovirus, influenza A y B y rinovirus. A las 48 horas de su ingreso, el paciente requirió apoyo ventilatorio mecánico invasivo. Una radiografía de tórax demostró infiltración de parénquima pulmonar bilateral, de mayor intensidad basal derecho. El control radiográfico mostró derrame pleural bilateral de predominio derecho y silueta cardiaca normal. (Figura 1). La evaluación fisiológica mediante la escala de Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II: 11), implicó una mortalidad del 12.9%. Los hemocultivos y urocultivos fueron negativos y el ecocardiograma fue normal. Tres días después de su ingreso a la UCI el paciente no presentó mejoría por lo que ante la sospecha de rickettsiosis se inicia el tratamiento con doxiciclina (100 mg) cada 12 horas por sonda nasogástrica. Los signos vitales se estabilizaron a las 48 horas posteriores al inicio del tratamiento y el paciente se extuba al cuarto día de iniciada esta terapia; dos días más tarde es trasladado a un cuarto hospitalario para continuar su terapia con doxiciclina. Su egreso hospitalario fue 29 de diciembre del 2013 sin secuelas.

Para confirmar que la infección fue provocada por un agente rickettsial, se realizaron pruebas serológicas y moleculares. Inicialmente se analizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos IgM e IgG (Focus Diagnostics © Kit, Cypress, USA) contra *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas, además de analizarse utilizando antígenos cultivados *R. rickettsii* (Taiacu) y *R. amblyommii* (AC37), siguiendo la metodología previamente descrita [21]. No se presentó respuesta de anticuerpos IgM contra ninguna de las dos especies de *Rickettsia*, pero hubo seroreacción a la titulación de 128 IgG para *R. amblyommii*. Por otra parte, se extrajo ADN de sangre del paciente utilizando el kit comercial QIAamp®DNA blood (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante y se realizó un PCR convencional para amplificar un segmento de 632 bp de un gen ompA usando un primer Rr190.70 y Rr190.701 para descartar infección por *Rickettsia* [22]. No se obtuvo amplificación, fue obtenida en la muestra de sangre.

Para el descarte de ehrlichiosis, al material genético obtenido se le practicó una PCR de anidada amplificando un fragmento del gen 16S rARN con los cebadores ECC y ECB, previamente descrito por Murphy et al. [23] y posteriormente una reacción secundaria fue implementada con los cebadores HE3 y ECAN5, el cual amplifica un segmento de 478 bp. Además se evaluaron los cebadores Dsb-330 y Dsb-728, que amplifican un fragmento de 409 pb del gen dsb, siguiendo el protocolo descrito [24]. Los productos amplificados que demostraron un tamaño de banda correcto fue purificado usando ExoSap (USB) y secuenciado en un secuenciador automatizado (Applied Biosystems model ABI Prism3130x1 Genetic, California,

Figura 1 muestra la progresión de la lesión pulmonar.



A. Proyección del 15 diciembre infiltración del parénquima pulmonar y derrame pleural bilateral de predominio derecho. B. Proyección del 16 de diciembre Persistencia de los infiltrados y del derrame pleural. C. Proyección del 20 de diciembre. Acentuación del proceso parenquimatoso pulmonar de predominio derecho, la silueta cardiaca es normal.

US). Las secuencias de los segmentos amplificados mostraron un 99% de homología con *E. canis* para el gen 16S rARN (Genbank KX766395.1) y de 100% el gen dsb (Genbank KY576856.1). Los datos obtenidos de esta secuenciación fueron ingresados al Genbank con el número de acceso MF789353.

DISCUSIÓN

Como es conocido diversas etiologías virales, bacterianas y parasitarias pueden presentar síntomas clínicos similares, por lo que se requiere de pruebas de laboratorio que ayuden a confirmar el agente causante [25]. Esto permite guiar el abordaje terapéutico temprano, el cual varía significativamente según el patógeno a controlar [26]. En este sentido, el uso de múltiples métodos para descartar diferentes patógenos, no solo beneficia directamente a la mejoría del paciente, sino que también disminuye el tiempo de hospitalización, lo que rebaja los costos hospitalarios.

En el presente caso los primeros tratamientos estuvieron dirigidos a controlar distintos tipos de enfermedades bacterianas (ceftriaxona, levofloxacina, vancomicina, gentamicina), pero no se administró inmediatamente el tratamiento contra rickettsiales.

La inefectividad de estos antibióticos fue demostrada con el detrimento en la salud del paciente. Paralelamente, al ingreso al hospital los primeros análisis de descartes correspondieron al diagnóstico de enfermedades virales o bacterianas más conocidas en la región y los análisis para detectar rickettsiales se dieron tardíamente. Incluso con este retraso, la sospecha clínica de una rickettsiosis propició el inicio del tratamiento con doxiciclina, con la consecuente mejoría del paciente.

Los primeros indicios de la importancia zoonótica de *E. canis* fueron señalados en Venezuela, donde se dieron las caracterizaciones en humanos. El primer caso se describe a partir de una infección asintomática en un hombre adulto inmuno-competente [5] y posteriormente, se caracterizan formas sintomáticas, con una intensidad de infección que varía de leve a moderada. En estos casos todos los pacientes presentaron fiebre, cinco de seis cursaron con cefalea y/o mialgias, 1 de seis presentó exantema, tres de cinco se observaron alteraciones hematológicas, uno con leucopenia y trombocitopenia y otro con anemia [6].

En el presente caso el paciente demostró compromiso sistémico; además, con el establecimiento de un síndrome de distrés respiratorio, se requirió soporte ventilatorio mecánico invasivo, y también presentó un cuadro de convulsión clónica generalizada. Lo anterior ameritó su ingreso a la UTI, donde la el puntaje de la escala APACHE II sugirió una mortalidad de 12.9%. Por lo tanto *E. canis* produce formas severas en un paciente joven inmuno-competente y sería el primero documentado en la región.

Algunos factores deben considerarse para el abordaje de casos de fiebres inespecíficas, especialmente al momento de la toma de muestra y la técnica de detección aplicada. Las diferencias en las rutas de infección entre bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Ehrlichia* varían

según las especies, lo que es importante el momento de la elección del método diagnóstico [26,27]. En términos generales *Rickettsia spp.* invade células epiteliales y su circulación en la sangre es de pocos días; mientras que *Ehrlichia spp.* invade células sanguíneas [1,28]. Estas diferencias determinan la técnica de diagnóstico a utilizar. En el caso de las pruebas serológicas, debido a que la seroconversión de títulos IgM a IgG es importante para el diagnóstico de las enfermedades rickettsiales, el tiempo de extracción de la sangre debe ser evaluado correctamente.

En este trabajo, la muestra de sangre para descartar las enfermedades rickettsiales se extrajo 10 días después de la inicial de los síntomas. La sero-reacción a los títulos de IgG (1: 128) debe considerarse con cuidado, ya que pueden reflejar una infección pasada por *Rickettsia*. Esto se debe a que no se obtuvo seroconversión IgM a IgG ni se obtuvieron amplificaciones de ADN de *Rickettsia*. En este sentido, *R. amblyommatidis* es la especie del género con mayor distribución en Panamá y se ha detectado en varias especies de garrapatas, incluyendo *R. sanguineus* s.l. colectados en David [16,18]. El papel patógeno de *R. amblyommatidis* no está totalmente definido, pero se sabe que estimula una respuesta inmune [29,30].

En Panamá y países vecinos hay poca gestión local sobre el conocimiento de la ecología y distribución de los vectores de enfermedades rickettsiales, lo que se refleja en el abordaje clínico. La amplia distribución de *R. sanguineus* s.l. en la región y su implicación como vector de *E. canis* y *R. rickettsii*, hace que estos tipos de enfermedades deban ser consideradas en el diagnóstico diferencial temprano.

CONCLUSIÓN

Tanto en el trópico como en regiones sub tropicales, un cuadro febril acompañado de cefalea, mialgias y compromiso del estado general en un paciente inmuno-competente, debe plantear un amplio diagnóstico diferencial. Por otro lado, la elevación de las transaminasas, trombocitopenia e hiponatremia; además de signos clínicos como petequias o rash, podría sugerir una enfermedad rickettsial y el tratamiento con doxiciclina debe iniciarse tempranamente [26].

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. Jorge Zavala Castro (Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán en Mérida, México) y al Dr. Newton Osborne por la revisión y comentarios al trabajo, al Dr. Manuel de La Cruz en la interpretación de los estudios radiográficos.

REFERENCIAS

- [1] Dumler, SJ, Barbet, AF, Bekker, C PJ, Dash, G A, Palmer, G H, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and HE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. 51, 2145–2165.
- [2] Dumler, J.S. Anaplasma and Ehrlichia infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005. 1063,361–373.
- [3] Donatien, A., Lestoquard, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 1935. 28, 418-419.
- [4] Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 2001. 23:685-715.
- [5] Perez, M., Rikihisa, Y., Wen, B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 1996. 34, 2133–2139
- [6] Pérez, M., Bador, M., Zhang, C., Xiong, Q., Rikihisa, Y. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006. 1078, 110–117.
- [7] Silva, A. B., Pina-Canseco, S., Gabriel-De la Torre, M. P., Mayoral-Silva, A., Mayoral, M. A. et al. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. *G Med Mex*, 2014. 150, 171-174.
- [8] Bouza-Mora, Dolz G, Solórzano-Morales A, Romero-Zúñiga J, Salazar-Sánchez L. et al. Novel genotype of Ehrlichia canis detected in samples of human bloodbank donors in Costa Rica. *T Tick-Borne Dis* 2016. 8(1): 36-40.
- [9] Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview. *The Veterinary Journal.* 2011; 187(3): 292-6.
- [10] Varela-Petrucci J, Bermudez S. Clinical and Serological Evidence of Canine Anaplasmosis and Ehrlichiosis in Urban and Rural Panama. *Ann Clin Cytol Pathology* 2017. 3(1): 1050.
- [11] de Rodaniche E & Rodaniche A. Spotted fever in Panama. Isolation of the etiologic agent from a fatal case. *Am J Trop Med Hyg* 1950. 30:511-517.
- [12] Calero C, Nuñez J, Silva R. Rocky Mountain spotted fever in Panama. Report of two cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1952. 1(4): 631-636.
- [13] Estripeaut D, Aramburú M, Sáez-Llorens X, Thompson H, Dasch G, Paddock C. et al. M. Rocky mountain spotted fever, Panama. *Emerg Infec Dis* 2007; 13:1763-1765.
- [14] Tribaldos M, Zaldivar Y, Bermúdez S, Samudio F, Mendoza Y, Martinez A, et al. J. Rocky Mountain spotted fever in Panama: a cluster description. *J Infect Develop Country.* 2011. 5(10):737-741.
- [15] De Luca J, García G, García E, Castro A, Lyons C, Bermúdez S. Nuevo caso de rickettsiosis humana en Panamá: primer reporte proveniente de un área silvestre. *Rev. Med Pan.* 2013. 34: 40-43.
- [16] Bermúdez S, Castro A, Trejos T, García G, Gabster A, Miranda R. et al. Distribution of Spotted Fever Group Rickettsia in hard ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian urban and rural environments. *EcoHealth.* 2016. 13: 274–284.
- [17] Perez A, Pile E, Torres A, Lasso J. Prevalence of canine ehrlichiosis among animals treated at the Corozal veterinary hospital of the faculty of veterinary medicine, university of Panama. *Arq Inst Biol* 2013; 80(2): 207-11.
- [18] Ferrer A, Brinkerhoff R.J, Bernal J, Bermudez SE. Ticks and tick-borne pathogens of dogs along an elevational and land-use gradient in Chiriquí province, Panamá. *Exp Appl Acarol* 2017. 71(4): 375-381
- [19] Martínez-Caballero, Moreno B, González C. et al. Descriptions of two new cases of Rocky Mountain spotted fever in Panama, and coincident infection with Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus sanguineus s.l. in an urban locality of Panama City, Panama. *J. Epi Infect.* In press 2018.
- [20] Bermudez S, Castro A, Esser H, Liefing Y, García G, Miranda R. Ticks (Ixodida) on humans from central Panama, Panama (2010-2011). *Exp Appl Acarol.* 2012. 58 (1): 81-88. DOI 10.1007/S10493-012-9564-7.
- [21] Horta, M., Labruna, M., Pinter, A., Linardi, P., Schumaker, T. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo. *Mem.Inst. Oswaldo.Cruz.* 2007.102, 793–801.
- [22] Roux V, Fournier E, Raoult D. Differentiation of spotted fever group Rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein romp A. *J. Clin Microbiol.*1996. 34(9): 2058–2065
- [23] Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, Kocan AA. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 1998; 79(4): 325-339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00179-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00179-4). 9831955.
- [24] Doyle C, Labruna M, Breitschewerdt E, Tang Y, Cortvet R, Hegarty B et al. Detection of medically important Ehrlichia by quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the dsb Gene. *J Mol Diagn.* 2005 Oct; 7(4): 504–510.
- [25] Mattar S, Alvis N, González M. Haemorrhagic Fevers Transmitted by Vectors in the Neotropics. In: Current topics of public health. 2013. Pag: 381-399.
- [26] Álvarez-Hernández G, González J, Hernández N, Lash R, Barton C, Paddock. Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present and future. *Lancet Infect Dis* 2017. 17: 189-195.
- [27] Oteo J, Nava S, Sousa R, Mattar S, Venzal J, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER

-
- para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev Chilena Infectol* 2014;31(1): 54-65.
- [28] Valbuena G. Patogénesis de las infecciones producidas por Rickettsias en las Américas. *Rev. MVZ Córdoba* 2010. 15(1): 2004-2006
- [29] Billeter, S. A., Blanton, H. L., Little, S. E., Levy, M. G., Breitschwerdt, E. Detection of "Rickettsia amblyommii" in association with a tick bite rash. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 2010. 7(4), 607-610.
- [30] Apperson, C. S., Engber, B., Nicholson, W. L., Mead, D. G., Engel, J. et al.. Tick-borne diseases in North Carolina: is "Rickettsia amblyommii" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 2008. 8(5), 597-606.