Garrapatas y anaplasmosis granulocítica humana en Europa. Revisión de la situación en España.

Pérez-Sánchez, R.[1]; Fernández-Soto, P.[2]; Encinas-Grandes A.[2]

[1] Unidad de Patología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Cordel de Merinas 40-52, 37008, Salamanca, España

[2] Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37008, Salamanca, España

Received: 11.07.2005 Accepted: 20.09.05

Resumen: La anaplasmosis granulocítica humana (AGH) es una zoonosis emergente causada por *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmataceae, Rickettsiales). Está extendida por todo el hemisferio Norte y es transmitida por garrapatas duras del complejo *Ixodes ricinus*. En Europa se han descrito 65 casos y más de 1000 en Norteamérica. En algunos países europeos se han detectado hasta un 25% de personas seropositivas. La diferencia entre seropositivos y casos clínicos se atribuye a diagnósticos incorrectos por falta de información previa y a la existencia de variantes apatógenas de *A. phagocytophilum*. La AGH comparte parcialmente reservorios y vectores con la enfermedad de Lyme. Los reservorios de *A. phagocytophilum* son micromamíferos, équidos y rumiantes, pero no aves. Sus principales vectores son las especies del complejo *Ixodes ricinus*, aunque en España se ha detectado la bacteria en larvas de *Neotrombicula autumnalis* (acaros trombicúlidos) y en otras nueve especies de ixódidos (*Haemaphysalis punctata*, *H. inermis*, *Riphicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Hyalomma marginaum* e *H. lusitanicum*), lo que convierte a esas especies en potenciales vectores.

Palabras clave: Anaplasmosis granulocítica humana, *Anaplasma phagocytophilum*, garrapatas, epidemiología

Abstract: Human granulocytic anaplasmosis (HGA) is an emerging zoonosis caused by *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmataceae, Rickettsiales). It spreads along the northern Hemisphere and it is transmitted by ixodid ticks from the *Ixodes ricinus* complex. Up to 65 and 1000 HGA cases have been confirmed in Europe and USA, respectively. Human seroprevalences reach the 25% in some European countries. Misdiagnosed clinical cases and the existence of non-pathogenic strains of *A. phagocytophilum* may account for the differences between the high seroprevalences and the low incidence of HGA cases. HGA and Lyme disease partially share reservoirs and vectors. Micro mammals, horses and ruminants, but not birds, are the reservoirs of *A. phagocytophilum*. Although the main vectors are the *I. ricinus* complex species, however, in Spain the bacteria has been detected in larvae of the trombiculid acarid *Neotrombicula autumnalis* and in nine other ixodid tick species (*Haemaphysalis punctata*, *H. inermis*, *Riphicephalus bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Hyalomma marginaum* and *H. lusitanicum*), making them potential secondary vectors

Key words: Human granulocytic anaplasmosis, *Anaplasma phagocytophilum*, ticks, epidemiology, tick-borne diseases

1. Introducción

Las anaplasmosis y ehrlichiosis humanas son enfermedades febriles agudas transmitidas por garrapatas y provocadas por bacterias de los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* (Orden Rickettsiales; Familia Anaplasmataceae). Durante esta última década las anaplasmosis y ehrlichiosis humanas se han convertido, por su alta incidencia y su morbilidad, en importantes enfermedades emergentes, siendo objeto de atención de diversos autores como muestran algunas de las revisiones más recientes sobre este tema: Buller *et al*. (1999), Dumler (1999), Bakken y Dumler (2000), Dumler y Walker (2001), Blanco y Oteo (2002), Strle (2004) y Oteo y Brouqui (2005). Según la información disponible, las especies de anaplasmas y ehrlichias capaces de producir enfermedad en las personas

Autor para correspondencia:
Dr. Ricardo Pérez Sánchez
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. CSIC.
C/ Cordel de Merinas, 40-52
37008 Salamanca, Spain
Tel: +34-923-219606
Fax: +34-923-219609
e-mail: ricarpe@usal.es

 © 2006 Sociedad Española de Parasitología (SEP)

son cuatro: *Ehrlichia sennetsu*, *E. chaffensis*, *E. ewingii* y *Anaplasma phagocytophilum*.

E. sennetsu (reclasificada como *Neorickettsia sennetsu* comb. nov.; Dumler *et al*., 2001) infecta a monocitos y macrófagos produciendo una enfermedad denominada Fiebre de Sennetsu, cuya presentación clínica es similar a la Mononucleosis infecciosa. Esta especie se distribuye por el lejano Oriente (Japón y Malasia) y no es transmitida por garrapatas sino por trematodos de peces, de manera que las personas se infectan al consumir pescado con vermes infectados.

Las otras tres especies sí son transmitidas por garrapatas. De ellas, *E. chaffeensis*, infecta a monocitos y macrófagos, produce la ehrlichiosis monocítica humana (EMH) y hasta la fecha sólo se ha detectado en Norteamérica, donde es transmitida por *Amblyomma americanum* y por *Dermacentor variabilis*.

E. ewingii infecta a los neutrófilos y produce en personas inmunodeprimidas una enfermedad similar a la anaplasmosis granulocítica humana (ver a continuación). Es transmitida por *A. americanum* y sólo se ha detectado en Estados Unidos. *E. ewingii* está emparentada con *E. canis*, un patógeno canino que también puede infectar a personas pero sin producir en ellas una enfermedad aparente (Pérez *et al*., 1996).

A. phagocytophilum infecta a los neutrófilos y causa la anaplasmosis granulocítica humana (AGH), enfermedad que previamente era conocida como "ehrlichiosis granulocítica humana". *A. phagocytophilum* es una sóla especie que engloba a lo que en principio se pensó que eran tres: *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* y el innominado "agente de la EGH". *A. phagocytophilum* se distribuye por Europa, Norteamérica y Asia y sus vectores son garrapatas del complejo *Ixodes ricinus*.

De la creciente importancia de la EMH y la AGH dan una idea los más de 1000 casos descritos para cada una de ellas en Estados Unidos así como sus altas incidencias anuales en ese país, que alcanzan, en zonas endémicas, hasta 100 (EMH) y 58 (AGH) casos por cada 100000 habitantes (Dumler y Walker, 2001).

En Europa, la AGH también se está convirtiendo en una infección importante, como indican las altas tasas de seropositividad frente a *A. phagocytophilum* encontradas en este continente (de un 7'5% a un 28%) y los 65 casos clínicos descritos hasta la fecha (Strle, 2004; Oteo y Brouqui, 2005).

De las anaplasmosis y ehrlichiosis aludidas, nuestro interés se centra en la anaplasmosis granulocítica humana y en su agente etiológico, *A. phagocytophylum*, por ser, en principio, el único patógeno de los antes citados que está presente en Europa (incluída España) (Blanco y Oteo, 2002; Strle, 2004; Oteo y Brouqui, 2005). En el presente trabajo revisaremos brevemente la historia y las características clínicas de la AGH, y a continuación, y con mayor detalle, su patrón epidemiológico en Europa y, en particular, el que muestra en España.

2. Historia de la anaplasmosis granulocítica humana

La anaplasmosis granulocítica causada por *A. phagocytophilum* es una zoonosis conocida en rumiantes domésticos desde 1932; su historia en humanos es, sin embargo, mucho más breve (Dumler y Walker, 2001).

La primera descripción de la enfermedad animal, un síndrome febril que afectaba a las ovejas, fue realizada en Escocia por Gordon *et al*. (1932), quienes demostraron además que era transmitida por *Ixodes ricinus* y la denominaron "fiebre transmitida por garrapatas". El agente infeccioso fue observado por primera vez al microscopio (en el interior de los neutrófilos de ovejas infectadas) por Foggie (1951), quién primero lo denominó *Rickettsia phagocytophila* y posteriormente lo reclasificó como *Cytoecetes phagocytophila*, porque presentaba significativas diferencias morfológicas con las rickettsias (Foggie, 1962). El género *Cytoecetes* se eliminó, como tal, y se incluyó en el género *Ehrlichia* en 1984, de modo que el agente de esta granulocitosis de los rumiantes pasó a denominarse *Ehrlichia phagocytophila* manteniéndose dicha denominación hasta en año 2001, cuando se reclasificó dentro del género *Anaplasma* como *Anaplasma phagocytophilum* comb. nov. (Dumler *et al*., 2001).

Paralelamente, Stannard *et al*. (1969) describieron los primeros casos de "ehrlichiosis granulocítica equina" y aislaron al agente denominándolo *Ehrlichia equi*. Poco después Lewis *et al*. (1975) comprobaron que esta especie se podía transmitir experimentalmente a perros, gatos y primates, señalando la posibilidad de que también fuera infectiva para las personas. Sus vectores se descubrieron más recientemente y se vio que eran los mismos que para *Ehrlichia phagocytophila*, es decir, *Ixodes pacificus* en Estados Unidos (Ritcher *et al*., 1996) e *I. ricinus* en Europa (Parola *et al*., 1998).

Por su parte, los primeros casos de infección humana por ehrlichias granulocíticas se describieron en Estados Unidos en 1994 (Chen *et al*., 1994; Bakken *et al.,* 1994). La enfermedad, que en algunos pacientes resultó letal, se denominó ehrlichiosis granulocítica humana (EGH) y al agente infeccioso lo denominaron como "agente de la EGH". Chen *et al*. (1994) secuenciaron el gen ARNr 16S de dicho agente y comprobaron que poseía una identidad del 99'9% y 99'8%, respectivamente, con el gen homólogo de *E. phagocytophila* y de *E. equi*, señalando ya la posibilidad de que las tres especies fueran una misma.

En Europa los primeros casos de EGH se notificaron poco después, en 1997 en Eslovenia, procedentes de una zona endémica de borreliosis de Lyme. El agente

infeccioso resultó ser idéntico al descrito por Chen *et al*. (*loc.cit*.) (Petrovec *et al*., 1997).

Desde esas primeras descripciones hasta la actualidad se han diagnosticado en Norteamérica y Europa numerosos casos de AGH y se han definido sus características clínicas. Tambien se ha confirmado que el agente de la EGH, *E. phagocytophila* y *E. equi* son una misma especie, la actual *A. phagocytophylum*, y, por último, se han averiguado cuales son sus principales vectores, reservorios y ciclos de transmisión.

3. Características clínicas de la anaplasmosis granulocítica humana

La AGH es una enfermedad febril aguda, benigna en la mayoría de las personas, grave en ancianos y asintomática o subclínica en los individuos más jóvenes (Bakken y Dumler, 2000; Cizman *et al*., 2000; Dumler y Walker, 2001; Strle, 2004; Oteo y Brouqui, 2005).

Su presentación clínica, que cabe calificar de inespecífica, recuerda a una infección viral de características similares a la gripe. Como regla general, tras la picadura de la garrapata, la enfermedad presenta un periodo de incubación de unos 7-10 días, al que sigue una fase aguda con malestar, rigidez, mialgias generalizadas, fuertes cefaleas y fiebre superior a 39 ºC. Estos signos van acompañados además por trombocitopenia, leucopenia y una elevación moderada del nivel sérico de las transaminasas hepáticas.

El 1’1-10’9% de los pacientes también muestran erupciones eritematosas cutáneas, por lo que algunos autores las incluyen como manifestaciones propias de la AGH, pero otros consideran que estas erupciones no forman parte del cuadro clínico de esta enfermedad, sino que son debidas a coinfecciones con el agente de la enfermedad de Lyme, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, la cual se detecta en el 11’4% al 21% de los pacientes con AGH (Fingerle *et al*., 1999a; Hunfeld y Brade, 1999; Bakken y Dumler, 2000; Skarphedinsson *et al*., 2001).

En el 16% de los pacientes, a las manifestaciones anteriores se añaden otras más graves, como síndromes similares a choques tóxicos y choques sépticos, síndromes respiratorios agudos, rhabdomiólisis, miocarditis o manifestaciones neurológicas (polineuropatías desmielinizantes) resultantes de la afectación de diversos sistemas orgánicos (Dumler y Walker, 2001; Oteo y Brouqui, 2005). Se desconoce si la aparición de estos síntomas está determinada por las particularidades del paciente, por las de la cepa infectante o por ambas. No obstante, el hecho de que todos estos síntomas se hayan observado tanto en pacientes americanos (Bakken *et al*., 1996) como en europeos (Bjöersdorff *et al*., 1999), infectados previsiblemente por cepas distintas, sugiere que dependen más bien del estado fisiológico del paciente.

A esa idea contribuye también el que la enfermedad sea más grave en ancianos, diabéticos y pacientes sometidos a terapia inmunosupresora, pudiendo ser incluso letal en un 0’5%-1% de los casos. En dichos casos la muerte fue debida, sobre todo, a infecciones oportunistas (Hardalo *et al*., 1995; Lepidi *et al*., 2000). Estas infecciones rara vez se observan en pacientes jóvenes sin otras patologías, por lo que cabe pensar que la inmunosupresión inducida por la propia AGH (neutropenia y linfopenia) no es, por si misma, tan intensa como para dejar al paciente desprotegido pero puede potenciar estados de inmunodepresión subyacentes facilitando la infección por patógenos oportunistas.

El tratamiento con doxiciclina resuelve la infección en unos días. En ausencia del mismo la mayoría de los enfermos se recuperan en menos de dos meses, sin que existan, por el momento, evidencias de infecciones crónicas ni de reactivaciones (Dumler y Walker, 2001).

4. Filogenia, taxonomía y nomenclatura de *Anaplasma phagocytophilum*

A. phagocytophylum y las ehrlichias productoras de enfermedad en humanos son bacterias pertenecientes al Orden Rickettsiales, aunque su nomenclatura y posición exacta dentro de dicho orden es, aún hoy, un tema controvertido. Las sucesivas reordenaciones de los microorganismos incluidos dentro del orden Rickettsiales han sido revisadas por Euzéby (2005) en su “Dictionnaire de Bacteriologie Vétérinaire”, cuya última actualización está disponible en internet en la página http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html.

Según el citado autor, las dos últimas propuestas taxonómicas para este orden son la del Manual de Bacteriología de Bergey (Garrity *et al*., 2004) y la del Taxonomy Browser del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html/).

Ambas clasificaciones son muy similares y coinciden en dividir el Orden Rickettsiales en tres Familias: Anaplasmataceae, Rickettsiaceae y Holosporaceae. Ambas incluyen los géneros *Aegyptianella*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Neorickettsia* dentro de Anaplasmataceae y los géneros *Rickettsia* y *Orientia* dentro de Rickettsiaceae. No obstante, difieren en la posición del género *Wolbachia*, que aparece en Anaplasmataceae en el Manual del Bergey y en Rickettsiaceae en el Taxonomy Browser.

Respecto a las anaplasmas y ehrlichias patógenas para las personas, ambas clasificaciones coinciden en su nombre y posición dentro de la familia Anaplasmataceae: *A. phagocytophylum*, *Ehrlichia chaffensis*, *E. ewingii* y *Neorickettsia sennetsu*.

5. Morfología, estructura y biología de *Anaplasma phagocytophilum*

Las características fenotípicas y biológicas de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* son bastante similares, diferenciándose esencialmente en su espectro de hospedadores y en las células que colonizan (Euzéby, 2005).

A. phagocytophilum se presenta en forma de cocos gram-negativos, redondeados o elipsoidales, de pequeño tamaño (0'2-1'5 µm). Su pared celular apenas contiene peptidoglicano y, a diferencia de *Rickettsia* sp. y *Orientia* sp.*;* su membrana externa es fina y sin engrosamientos, aunque en *A. phagocytophilum* dicha membrana presenta abundantes pliegues que la distinguen de otras ehrlichias como *E. chaffensis* y *N. sennetsu* (Popov *et al*., 1998). En su interior los orgánulos más aparentes son los ribosomas, que se disponen repartidos por todo el citoplasma o bien condensados en el centro según el tipo de célula bacteriana (ver a continuación). Su genoma es pequeño (1'5 kb) y junto con los de *E. chaffensis* (1'2 kb) y *N. sennetsu* (0'9 kb) están ya prácticamente secuenciados (TIGR Microbial Database: a listing of microbial genomes and chromosomes in progress; http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html).

A. phagocytophilum es un parásito intracelular, aerobio estricto, que infecta a los neutrófilos del hospedador. La penetración en la célula diana es un proceso de endocitosis mediada por la unión de la bacteria al ligando de la P-selectina (PSGL-1) en la superficie del neutrófilo (Carlyon y Frikrig, 2003), tras la cual la bacteria queda alojada en el interior de un endosoma citoplasmático donde se multiplica por fisión binaria originando unas agrupaciones denominadas mórulas en las que se observan dos tipos de células: unas pequeñas (0'2-0'4 µm), electrodensas y con los ribosomas condensados en el centro, que se denominan "cuerpos elementales", y otras más grandes (0'8-1'5 µm), de aspecto reticulado y con los ribosomas repartidos por todo el citoplasma, que se denominan "cuerpos reticulados". La salida de las bacterias al plasma tiene lugar tras provocar la lisis celular o bien tras la fusión de la membrana del endosoma con la membrana plasmática de la célula hospedadora. Las bacterias alojadas en el endosoma escapan a su destrucción por la célula hospedadora evitando que dicho endosoma se funda con los lisosomas e inhibiendo la producción de especies tóxicas del oxígeno. Esta bacteria también inhibe la apoptosis de los neutrófilos infectados e induce la expresión del interleucina 8, atrayendo a nuevos neutrófilos y facilitando así su dispersión por el organismo del hospedador (Rikihisa, 1999; Dumler y Walker, 2001; Carlyon y Fikrig, 2003).

6. Epidemiolgía de la AGH y de *Anaplasma phagocytophilum*

Aunque la anaplasmosis granulocítica animal se conocía desde los años treinta (Gordon *et al*., 1932), esta enfermedad y su agente etiológico (*A. phagocytophilum*) no despertaron excesivo interés hasta 1994, momento en que se detectaron los primeros casos de infección humana (Chen *et al*., 1994). Desde entonces se han publicado numerosos trabajos en los que se aportan datos epidemiológicos puntuales y algunas revisiones en las que se incluye un análisis epidemiológico más global (McQuiston *et al*., 1999; Bakken y Dumler, 2000; Dumler y Walker, 2001; Olano y Walker, 2002; Strle, 2004; Oteo y Brouqui, 2005).

El patrón epidemiológico de la AGH recuerda al de la enfermedad de Lyme porque, en buena medida, comparten distribución, vectores, reservorios animales y ciclos de transmisión.

6.1. Distribución

A. phagocytophilum muestra una amplia distribución geográfica, pues se extiende por todo el hemisferio norte, desde Canadá hasta China, coincidiendo casi exactamente con la distribución de *B. burgdorferi* sensu lato (Cao *et al*., 2000; Bakken y Dumler, 2000; Dumler y Walker, 2001; Strle, 2004).

En Europa, *A. phagocytophilum* se distribuye por todo el continente. Prueba de ello son la existencia de personas seropositivas en numerosos países (Tabla 1), así como la presencia del patógeno en garrapatas (ver Tabla 2) y en macro y micromamíferos de la mayoría de los países europeos (Parola, 2004; Strle, 2004).

Por el contrario, la extensión e incidencia de la AGH parece ser mucho más restringida que la de su agente, puesto que hasta la fecha sólo se han confirmado 65 casos clínicos de AGH en toda Europa, a pesar de las altas seroprevalencias humanas detectadas en algunos países (Tabla 1). Las infecciones asintomáticas, la existencia de cepas apatógenas de *A. phagocytophilum* (Portillo *et al*., 2004) y los probables diagnósticos erróneos, debidos a la falta de información previa y a la inespecificidad de los síntomas, pueden explicar estas diferencias entre la incidencia de la AGH y la de su agente.

En cuanto a la distribución temporal de la AGH, tanto en Europa (como en Estados Unidos) se observa una clara estacionalidad, similar a la de la enfermedad de Lyme. La mayoría de los casos se registran en el verano y a finales del otoño, periodo este en el que coinciden la aparición en la naturaleza de las ninfas y de los adultos de *Ixodes* sp. y los periodos de máxima actividad humana en el campo, lo que facilita el contacto entre personas y garrapatas infectadas (Dumler y Walker, 2001, Strle, 2004).

Tabla 1. Países europeos con personas seropositivas frente a *Anaplasma phagocytophilum* y/o con casos confirmados de AGH hasta 2004.

País	**Países con personas seropositivas (%)**	**Países con casos de AGH**	*Referencias*
Alemania	SI (5'5-19'5 %)		Baumgarten *et al*., 1999 Fingerle *et al*., 1999a, 1999b Hundfel y Brade, 1999 Batzin-Feingenbaum *et al*., 2000 Woessener *et al*., 2001
Bulgaria	SI (2'9-20 %)		Christova y Dumler, 1999
Croacia		SI	Missic-Majerus *et al*. 2000
Dinamarca	SI (3'8-21 %)		Lebech *et al*., 1998 Skarphedinsson *et al*., 2001
Eslovenia	SI (15'4%)	SI	Petrovec *et al*., 1997 Lotrict-Furlan *et al*., 1998a,b, 2001 Cizman *et al*., 2000
España	SI (1'4%)	SI	Oteo *et al*., 2000, 2001
Francia		SI	Remy *et al*., 2003
Holanda	SI	SI	Dobbenburgh *et al*., 1999
Israel	SI (0'1 %)		Keysary *et al*., 1999 Brouqui y Dumler, 2000
Italia	SI (1'5 %)	SI	Cinco *et al*., 1998 Nuti *et al*., 1998 Favia *et al*., 2001 Ruscio y Cinco, 2003
Noruega	SI (15-20%)	SI	Bjoersdorff *et al*., 1999
Polonia	SI (6'2 %)	SI	Tylewska *et al*., 2001 Grzeszczuk *et al*., 2002
Reino Unido	SI (1'5 %)		Ogden *et al*., 1998 Thomas *et al*., 1998
República Checa	SI (13'5-21 %)	SI	Hulinska *et al*., 2001 Zeman *et al*., 2002
Suecia	SI (11'4-20 %)	SI	Dumler *et al*., 1997 Gustafson y Artursson, 1999 Bjoersdorff *et al*., 1999
Suiza	SI (10-25 %)		Weber *et al*., 2000
Total: 16	**Total: 14**	**Total: 10**	

Tabla 2. Porcentajes de infección por *A. phagocytophilum* en las garrapatas del complejo *I. ricinus* en Europa, Estados Unidos y China en estudios llevados a cabo hasta el 2003. **A**, ejemplares adultos; **N**, ninfas.

País o Estado		**% de ejemplares infectados**				***Referencias***
		I. pacificus	***I. scapularis***	***I. ricinus***	***I. persulcatus***	
EEUU	California	4’7- 6’7 %				Kramer *et al*., 1999
	California	0’8 %				Barlough *et al*., 1997
	Delaware		1-8 %			Curran *et al*.. 2000
	Massachussetts		25 %			Chang *et al*., 1998
	Nueva York		32-53 % A 21% N			Schwartz *et al*., 1997
	Nueva York		9 %			Chang *et al*., 1998
	Wisconsin		10’3% A			Pancholi *et el*.; 1995
Europa	Alemania			2’2 %		Baumgarten *et al*., 1999
	Alemania			1’6 %		Fingerle *et al*., 1999a,b
	Bulgaria			34 % A 2 % N		Christova *et al*., 2001
	Eslovenia			3’2 %		Petrovec *et al*., 1999
	España			5’3 % A 2’5-24% N		Oteo *et al*. 2001
	Italia			24 %		Cinco *et al*., 1998
	Noruega			6-11 % 16 %		Jenkins *et al*., 2001
	Polonia			19,5 % A 1,4 % N		Grzeszczuk *et al*., 2002
	Reino Unido (Escocia)			2,1 % A 0’2-2 % N		Alberdi *et al*., 1998
	Suiza			0’8 %		Pusterla *et al*., 1998
	Suiza			1’3 % 1’6 % A 0’5 % N		Pusterla *et al*., 1999
	Suiza			1’4 %		Liz *et al*., 2000
Asia	China				0’8 %	Cao *et al*., 2000

6.2. Vectores

A. phagocytophilum utiliza como principales vectores a las garrapatas del complejo *Ixodes ricinus*: *I. ricinus* en Europa, *I. persulcatus* en Asia e *I. scapularis* e *I. pacificus* en Estados Unidos (Cao *et al*., 2000; Dumler y Walker, 2001; Semenov *et al*., 2001).

Junto a las anteriores, existen otras especies de *Ixodes* sp. (no pertenecientes al complejo *I. ricinus*) que también pueden ser vectores competentes para esta bacteria. Tal es el caso de *I. trianguliceps*, una garrapata europea específica de roedores, en la que Ogden *et al*. (1998) han detectado la presencia de *A. phagocytophilum*. Aunque los citados autores no han comprobado experimentalmente la capacidad vectorial de esta especie, sugieren que, en los lugares donde está presente, también participa en la transmisión de la bacteria entre roedores silvestres. Igualmente es éste el caso de *I. spinipalpis*, una garrapata americana que transmite eficazmente la bacteria entre las ratas de género *Neotoma* sp. (Zeidner *et al*.,,2000). En todas esas garrapatas la bacteria se transmite transestádicamente, pero no se ha observado que exista en ellas transmisión transovárica (Ogden *et al*., 1998; Dumler y Walker, 2001).

Salvo en España (ver más adelante, Barral Lahidalga, 1998 y Fernández Soto, 2003), no se han encontrado garrapatas de géneros distintos a *Ixodes* sp. infectadas con *A. phagocytophilum*, ni siquiera entre aquellas que son eficientes vectores para otras ehrlichias, como por ejemplo *Amblyomma americanum* (que transmite a *Ehrlichia chaffensis* y *E. ewingii*) o *Rhipicephalus sanguineus* (vector de *E. canis* y *Anaplasma platys*). Los estudios de transmisión llevados a cabo con *Amblyomma americanum* y *A. maculatum* han demostrado su incapacidad como vectores de *A. phagocytophilum* (Ewing *et al*., 1995, 1997).

Por otra parte, se desconoce si *A. phagocytophilum* puede ser transmitida por artrópodos hematófagos distintos de las garrapatas como, por ejemplo, los ácaros trombicúlidos. Fernández Soto *et al*. (2001) detectaron la bacteria en larvas de *Neotrombicula autumnalis* capturadas en la vegetación. Dado que en los ácaros trombicúlidos sólo las larvas son hematófagas, la presencia de la bacteria en larvas capturadas en la vegetación, y por tanto no alimentadas, implica necesariamente la existencia de mecanismos de transmisión transovárica. No obstante, no se han llevado a cabo más estudios con estos ácaros y su capacidad para transmitir a *A. phagocytophilum* a los vertebrados está aun por probar, por lo que hasta la fecha todos los autores asumen que los únicos vectores de *A. phagocytophilum* son las especies de ixódidos antes citadas.

De acuerdo con lo anterior, cabría señalar, por tanto, que *A. phagocytophilum* muestra una notable especificidad por su vector. Sin embargo, nada hay descrito acerca de la naturaleza de dicha especificidad y de si ésta es real o tan sólo aparente, y atribuible, por tanto, al simple desconocimiento de otros posibles vectores.

En cuanto a la prevalencia de *A. phagocytophilum* en las garrapatas, son ya abundantes los artículos en los que se pueden encontrar datos de infección de las pertenecientes al complejo *I. ricinus*. Salvo excepciones (los efectuados en España), la mayor parte de ellos son estudios puntuales, llevados a cabo en zonas geográficas reducidas y durante cortos periodos de tiempo (varios meses o a lo sumo un año). Sin prestender ser exhaustivos, de los citados trabajos, se han seleccionado, e incluido en la tabla 2, a los que efectuaron el estudio en ejemplares recogidos en la vegetación y utilizaron la PCR como método de detección de la bacteria, que, conviene señalarlo, fueron la mayoría de los publicados. De este modo los datos ofrecidos resultan más homogéneos y comparables.

En dicha tabla se han incluido también algunos trabajos referentes a Estados Unidos. En ese país se observa que la bacteria es transmitida principalmente por *I. pacificus* en el oeste e *I. scapularis* en el noreste; también se comprueba que su prevalencia en las poblaciones de *I. pacificus* (0'8-6'7 %) es notablemente inferior a la que muestra en las de *I. scapularis* (53%) y que esta diferencia está en relación con el mayor número de casos de AGH en las zonas endémicas del noreste del país (hasta 58 casos por cada 100000 habitantes en Wisconsin; Dumler y Walker, 2001).

La tabla 2 también muestra que en Europa su vector más importante, y casi el único claramente establecido hasta la fecha, es *I. ricinus*. En esta especie los porcentajes de infección varían considerablemente entre los distintos países y dichas variaciones no parecen seguir pauta alguna: los porcentajes más elevados se registran en países del norte y del este (19'5% en Polonia, 34% en Bulgaria), pero también se observan porcentajes de similar magnitud en los del sur (24% en Italia y España). En el resto de los países examinados la tasa de infección es mucho más baja, en torno al 2%, similar al registrado en el oeste americano.

Estos porcentajes de infección varían según la fase evolutiva de las garrapatas. Salvo excepciones (datos referentes a España, ver Oteo et al., 2001), los más elevados se registran entre los ejemplares adultos, mientras que en las ninfas son hasta 10 veces más bajos (casos de Bulgaria, Polonia y Reino Unido; ver Alberdi *et al*., 1998, Christova *et al*., 2001 y Grzeszczuk *et al*., 2002). No se han encontrado larvas infectadas, hecho este poco sorprendente al no haberse descrito aún la existencia de un mecanismo de transmisión transovárica en ixódidos.

Tambien se ha descrito que, en general, en un determinado país o zona geográfica, los porcentajes de infección por *A. phagocytophilum* son más bajos que los

de *B. burgdorferi* sensu lato. Tal es, por ejemplo, el caso de Alemania, donde Baumgarten *et al*. (1999) encontraron un 2'2% de *I. ricinus* infectados por *A. phagocytophilum* y un 21'8% de infectados por *B. burgdorferi* sensu lato.

En las garrapatas (tanto en América como en Europa) son frecuentes las coinfecciones por *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* sensu lato. Hasta un 30% de los ejemplares infectados con *A. phagocytophilum* también lo están con *B. burgdorferi*. La inversa no es cierta, pues la mayor abundancia de garrapatas monoinfectadas con *B. burgdorferi* reduce el porcentaje de coinfección en unas 10 veces (Cinco *et al*., 1997, 1998; Baumgarten *et al*., 1999; Leutenegger *et al*., 1999; Levin y Fish, 2000a, Christova *et al*., 2001). Las coinfecciones son unas 7 a 10 veces más frecuentes en adultos que en ninfas (Levin y Fish, 2000a), lo que sugiere que la adquisición de la coinfección tiene lugar, normalmente, en tomas de sangre consecutivas y menos habitualmente de forma simultánea en una única toma de sangre. De ahí que los adultos, que han tomado sangre dos veces, presenten porcentajes de coinfección superiores a los de las ninfas (Levin y Fish, 2000a).

Se ha comprobado también que, durante su ciclo en el vector, estos dos patógenos no interfieren entre sí y que las garrapatas con doble infección transmiten a cada uno de los patógenos tan eficazmente como las portadoras de infecciones simples, lo que, sin duda, contribuye a que en los hospedadores susceptibles a ambos patógenos, como los roedores y las personas, sean también frecuentes las coinfecciones (Mitchell *et al*., 1996; Magnarelli *et al*., 1997; Nadelman *et al*., 1997; Levin *et al*., 1999; Levin y Fish, 2000a; Liz *et al*., 2000).

6.3. Reservorios

Los reservorios de *A. phagocytophilum* son, en parte, los mismos que los de *B. burgdorferi* sensu lato, pues ambas bacterias utilizan a los roedores (ratas, ratones, topillos y ardillas) como reservorios principales (Liz *et al*., 2000; Levin y Fish, 2002b). Pero a diferencia de *B. burgdorferi* sensu lato, para *A. phagocytophilum* también son reservorios competentes los équidos y los rumiantes, tanto domésticos (vacas y ovejas) como silvestres (ciervos, alces, llamas y bisontes). Las aves, sin embargo, no son reservorios competentes para *A. phagocytophilum* (Daniels *et al*., 2000), aunque pueden contribuir a su dispersión al transportar garrapatas infectadas a grandes distancias (Bjöesdorff *et al*., 2001). Por el momento se desconoce la base de la especificidad anaplasma-reservorio.

6.4 Ciclos de transmisión

La consecuencia inmediata de compartir parcialmente vectores y reservorios es que estos dos patógenos, *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* sensu lato, presentan ciclos de transmisión similares, aunque no del todo idénticos (Levin *et al*., 1999). Los ciclos de transmisión de *A. phagocytophilum* serían, en líneas generales, los siguientes: las larvas de *Ixodes* sp. se infectan, a finales de la primavera y el verano, al alimentarse sobre roedores infectados. La infección se transmite transestádicamente a las ninfas, las cuales infectarán a nuevos hospedadores (básicamente micromamíferos) cuando realicen la toma de sangre durante el otoño o, tras hibernar, a principios de la siguiente primavera. Estos nuevos hospedadores infectados serán la fuente de infección para la siguiente generación de larvas. Los adultos que surgen tras la muda de las ninfas infectadas mantienen la infección y la transmiten a sus principales hospedadores, équidos y rumiantes. No obstante, como la infección no se transmite transováricamente a la descendencia, la nuevas generaciones de larvas no son portadoras de *A. phagocytophilum*. Este hecho y el que los inmaduros de *Ixodes* sp. se alimenten preferentemente sobre micromamíferos, restan importancia a los rumiantes y équidos como fuente de infección humana, puesto que a partir de ellos es improbable que emerjan vectores infectados. Esta situación se invierte en ausencia de micromamíferos. En tales casos, todas las fases de *Ixodes* sp. se alimentan sobre los hospedadores disponibles (rumiantes) y desde éstos pueden transmitir la infección al hombre.

Las personas resultan infectadas cuando penetran en los hábitats colonizados por garrapatas, lo que suele ocurrir a finales del verano y en otoño, al ser picados por las ninfas y los adultos que surgen tras la muda de las larvas y las ninfas infectadas y, en menor medida, en primavera, al recibir picaduras de las ninfas y los adultos que no se alimentaron en otoño y que sobrevivieron al invierno.

En Estados Unidos, *A. phagocytophilum* muestra dos ciclos de transmisión, ambos similares a los de la enfermedad de Lyme (Bakken y Dumler, 2000; Dumler *et al*.,, 2001). Uno se desarrolla en el este y centro del país, entre el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) y los inmaduros (larvas y ninfas) de *Ixodes scapularis*, que se alimentan sobre estos ratones (Levin y Fish., 2000b). Las ninfas infectadas son las principales transmisoras de la infección a las personas, lo cual suele ocurrir durante el final de la primavera y el verano. Los adultos infectados de *I. scapularis* transmiten la infección a los ciervos (*Odocoileus virginianus*), los cuales desempeñan entonces un doble papel: el de reservorios de la bacteria y el de fuente de alimento imprescindible para el mantenimiento de las poblaciones de *I. scapularis* (Belongia *et al*., 1997). El segundo ciclo tiene lugar en el oeste del país, donde los casos de AGH son menos frecuentes. Allí la ehrlichia es mantenida en la naturaleza entre roedores (*Neotoma* sp.) e *Ixodes spinipalpis*. Al ser *I. spinipalpis* muy poco

antropofílica, la transmisión a los humanos requiere el concurso de otra garrapata, *I. pacificus*, cuyos inmaduros pican con frecuencia al hombre. Sin embargo, estos inmaduros rara vez son portadores de la ehrlichia porque su hospedador principal es *Sceloporus occidentalis* (un lagarto incompetente como reservorio de la bacteria) y sólo ocasionalmente se alimentan sobre *Neotoma* sp. pudiendo entonces infectarse. La consecuencia de este comportamiento es una baja proporción de inmaduros de *I. pacíficus* infectados (0'8 %) (Barlough *et al*., 1997) y, por tanto, un mínimo riesgo de transmisión a las personas, lo cual explica el menor número de casos de AGH en esa parte del país.

En Europa, *A. phagocytophilum* presenta dos tipos de ciclos paralelos e interconectados. En el primer tipo los reservorios son micromamíferos de diversas especies, como musarañas (*Crocidura russula*, *Sorex coronatus*), ratones (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*), topillos (*Pitymys subterraneus*, *Clethrionomys glareolus*) y ardillas (*Sciurus vulgaris*), y los vectores son *I. trianguliceps*, específica de roedores, e *I. ricinus*, cuyos inmaduros se alimentan preferentemente sobre micromamíferos (Ogden *et al*., 1998; Liz *et al*., 2000). En el segundo tipo de ciclo, los reservorios son ambos, los micromamíferos y grandes mamíferos (équidos y rumiantes), y el vector es *I. ricinus*. Los inmaduros de *I. ricinus* se infectan al alimentarse sobre roedores y, tras mudar a adultos, transmiten la infección a los rumiantes (Liz *et al*., 2002). En ausencia de roedores el ciclo se mantiene entre rumiantes e *I. ricinus*, cuyos inmaduros pueden alimentarse sobre grandes mamíferos como hospedadores alternativos (Ogden *et al*., 2002a, 2002b).

7. Aspectos de la AGH en España

En nuestro país, los trabajos acerca de *A. phagocytophilum* y la AGH son aún escasos y los que se han hecho se refieren casi exclusivamente a las comunidades autónomas de La Rioja, País Vasco y Castilla y León. No obstante, desde 2003 se ha constituido una Red de vigilancia de zoonosis bacterianas transmitidas por garrapatas (EBATRAG) finaciada por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS G03/057), que incluye en los objetivos de su estudio a *A. phagocytophylum* entre otros patógenos. Dicha red, a la que pertenecen los autores del presente artículo, se extiende por las comunidades autónomas de La Rioja, País Vasco, Castilla y León y Madrid, y durante el último año se han incorporado también grupos de investigadores de las Islas Canarias. Los resultados de los estudios de esta red están comenzando a hacerse públicos y entre ellos los referentes a *A. phagocytophilum*

En conjunto, todos los trabajos aludidos revelan lo siguiente. Primero, que *A. phagocytophilum* está presente en España en las comunidades autónomas de La Rioja, País Vasco, Castilla y León y Madrid y, previsiblemente, también en todas aquellas donde coincidan sus vectores y sus reservorios como son, prácticamente, todas las del norte (Oteo y Blanco, 1999; Fernández Soto, 2003; Oporto *et al*., 2003; Barandika *et al*., 2005; Olmeda *et al*., 2005).

Segundo, que a diferencia de lo observado en Europa, donde *A. phagocytophilum* sólo se ha encontrado en *I. ricinus* e *I. trianguliceps*, en España se ha detectado ADN de *A. phagocytophilum* hasta en diez especies de ixódidos. Cinco de ellas capturadas en el País Vasco en la vegetación: *I. ricinus* (adultos y ninfas), *Haemaphysalis punctata* (adultos, ninfas y larvas), *H. inermis* (adultos), *Riphicephalus bursa* (adultos) y *Dermacentor reticulatus* (adultos) (Barral Lahidalga, 1998). Paralelamente, en La Rioja, Oteo y Blanco (1999) y Oteo *et al*. (2001) encontraron también adultos y ninfas de *I. ricinus* infectados por la bacteria. Por último, tras un estudio llevado a cabo durante 7 años en Castilla y León, Fernández Soto (2003) detectó ADN de *A. phagocytophilum* en 9 especies de ixódidos retirados de personas: *I. ricinus* (adultos, ninfas y larvas), *R. bursa* (adultos), *R. sanguineus* (adultos y ninfas), *R. turanicus* (adultos y ninfas), *D. marginatus* (adultos y ninfas), *D. reticulatus* (adultos), *H. punctata* (adultos), *Hyalomma marginaum* (adultos), e *H. lusitanicum* (adultos y ninfas).

Tercero, que de acuerdo con Barral Lahidalga (1998), la presencia de la bacteria en los ejemplares recogidos sin alimentar, a partir de la vegetación, no es un simple fenómeno transitorio debido a la ingestión de sangre infectada, sino una auténtica infección transmitida transestádicamente. Es más, la presencia de la bacteria en las larvas de *H. punctata* indicaría también la existencia de un mecanismo de transmisión transovárica, al menos en esta especie. Por lo tanto, en España, además de *I. ricinus*, existen otras cuatro especies que también pueden ser vectores de *A. phagocytophilum*, aunque para demostrarlo categóricamente sería necesario comprobar que son capaces de transmitir la infección a un nuevo hospedador durante su alimentación. Igualmente interesante sería hacer esta comprobación para las cuatro especies adicionales retiradas de personas en las que Fernández-Soto (2003) detectó ADN de la bacteria.

Cuarto, que *A. phagocytophilum* utiliza como reservorios, previsiblemente, a los hospedadores de los ixódidos señalados en el punto anterior, esto es, micromamíferos y rumiantes silvestres (Oporto *et al*., 2003; Barandika *et al*., 2005), perros, équidos y, sobre todo, rumiantes domésticos. De hecho fueron ovejas y vacas los animales donde se detectó su presencia en España por primera vez (Juste et al., 1986, 1989), y, al menos en el País Vasco, este patógeno está ampliamente distribuido en las poblaciones de ovinos (Barral Lahidalga, 1998).

Y quinto, que en España las infecciones humanas por *A. phagocytophilum* no sólo son posibles, sino también relativamente frecuentes. En este sentido son reveladores los trabajos de Oteo *et al*. (2000, 2001), que encontraron en La Rioja un 1,4% de personas seropositivas (proporción que ascendía hasta un 2,3% en enfermos de Lyme) y que describieron, además, el primer caso confirmado de AGH en este país. El hallazgo en La Rioja de variantes no patógenas de la bacteria (Portillo *et al*., 2004) podría justificar el bajo número de casos de anaplasmosis granulocítica humana en nuestro país (Guerrero *et al*., 2001).

En definitiva, cabe afirmar que, en España, la AGH y su agente etiológico están todavía poco estudiados y la información existente es aún escasa. Pero, pese a ello, puede afirmarse ya que la ehrlichiosis granulocítica es una infección importante desde el punto de vista médico y veterinario y que, además, en nuestro país, esta zoonosis presenta ciertas particularidades distintivas como su mayor espectro de posibles vectores.

8. Agradecimientos.

Trabajo finaciado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS, G03/057) y por la Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Castilla y León.

9. Referencias.

Alberdi, M.P.; Walker, A.R.; Pastón, E.A. and Sumption, K.J. 1998. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* in Scotland. *Vet Parasitol*, 78, 203-213.

Bakken, J.S. and Dumler, J.S. 2000. Human granulocytic Ehrlichiosis. *Clin Infect Dis*, 31, 554-560.

Bakken, J.S.; Dumler, J.S.; Chen, S.M.; Ekman, M.R.; Van Etta, L.L. and Walker, D.H. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: a new species emerging?. *J Am Med Assoc*, 272, 212-218.

Bakken, J.S.; Krueth, M.T.; Wilson-Nordskog, C.; Tilden, R.L.; Asanovich, K. and Dumler, S.J. 1996. Clinical and laboratory characteristics of Human granulocytic ehrlichiosis. *J Am Med Assoc*, 275, 199-205.

Barandika, J.F.; Hurtado, A.; Oporto, B.; Gil, H.; Anda, P.; Escudero, R.; Barral, M.; Povedano, I. and García-Pérez, A. 2005. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in small mammals captured in northern Spain. Seasonal activity of ticks and tick-borne pathogens in central Spain. Book of Abstracts of the 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Logroño, Spain, P-91.

Barlough, J.E.; Madigan, J.E.; Kramer, V.L.; Clover, J.R.; Hui, L.T.; Webb, J.P. and Vredevoe, L.k. 1997. *Ehrlichia phagocytophila* genogroup *Rickettsia* in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol*, 35, 2018-2021.

Barral Lahidalga, M. 1998. Estudio de la infección por *Borrelia burgdorferi*, grupo *Ehrlichia phagocytophila* y virus de la encefalitis ovina en las poblaciones de ixódidos de la comunidad autónoma vasca. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, España.

Batzing-Feigenbaum, J.; Kallischnigg, G.; Ruden, H. and Talaska, T. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. New tick bite disease lies in wait also in German forests. *MMW Fortschr Med*, 142, 32-34.

Baumgarten, B.U.; Rollinghoff, M. and Bogdan, C. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol*, 37, 3448-3451.

Belongia, E.A.; Reed, K.D.; Mitchell, P.D.; Kolbert, C.P.; Persing, D.H.; Gill, J.S. and Kazmierczak, J.J. 1997. Prevalence of granulocytic ehrlichia infection among white-tailed deer in Wisconsin. *J Clin Microbiol*, 35, 1465-1468.

Bjöersdorff, A.; Berglund, J.; Kristiansen, B.E.; Soderstrom, C. and Eliasson, I. 1999. Varying clinical picture and course of human granulocytic Ehrlichiosis. Twelve Scandinavian cases of the new tick-borne zoonosis are presented. *Lakartidningen*, 96, 420-4204.

Bjöersdorff, A.; Bergström, S.; Massung, R.F.; Haemig, p.d. and Olsen, D. 2001. *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emer Infect Dis*, 7, 877-879.

Blanco, J.R. and Oteo, J.A. 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 8, 763-772.

Brouqui, P. and Dumler, J.S. 2000. Serologic evidence of human monocytic and granulocytic Ehrlichiosis in Israel. *Emer Infect Dis*, 6, 314.

Buller, R.S.; Arens, M.; Hmiel, S.P.; Paddock, C.D.; Sumner, J.W.; Rikihisa, Y.; Ahmet Unver, A.; Gaudreault-Keener, M.; Manian, F.A.; Liddell, A.M.; Schmulewitz, N. and. Storch, G.A. 1999. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human Ehrlichiosis. *New Engl J Med*, 341, 148-155.

Cao, W.C.; Zhao, Q.M.; Zhang, P.H.; Dumler, S.J.; Zhang, X.T.; Fang, L.Q. and Yang, H. 2000. Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *J Clin Microbiol*, 38, 4208-4210.

Carlyon, J.A. and Fikrig, E. 2003. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol*, 5, 743-751.

Chang, Y.F.; Novosel, V.; Chang, C.F.; Kim, J.B.; Shin, S.J. and Lein, D.H 1998. Detection of human granulocytic ehrlichiosis agent and *Borrelia burgdorferi* in ticks by polymerase chain reaction. *J Vet Diag Invest*, 10, 56-59.

Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Bakken, J.S. and Walker, D.H. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*, 32, 589-595.

Christova, I.; Schouls, L.; Van De Pol, I.; Park, J.; Panayotov, S.; Lefterova, V.; Kantardjiev, T. and Dumler, J.S. 2001. High prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *J Clin Microbiol*, 39, 4172-4174.

Christova, I.S. and Dumler, J.S. 1999. Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria. Am J Trop Med Hyg, 60, 58-61.

Cinco, M.; Padovan, D.; Murgia, R.; Maroli, M.; Frusteri, L.; Heldtander, M.; Johansson, K.E. and engvall, K.O. 1997.

Coexistence *of Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*, 35, 3365-3366.

Cinco, M.; Padovan, D.; Murgia, R.; Heldtander, M. and Engvall, K.O. 1998. Detection of HGE agent-like Ehrlichia in *Ixodes ricinus* ticks northern in Italy by PCR. *Wien Klin Wochenschr*, 110, 898-900.

Cizman, M.; Avsic-Zupanc, T.; Petrovec, M.; Ruzuc-Sablijc, E. and Pokorn, L. 2000. Seroprevalence of ehrlichiosis, Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis infections in children and young adults in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr*, 112, 842-845.

Curran, K.L.; Kidd, J.B.; Vassallo, J. and Van Meter, V.L. 2000. *Borrelia burgdorferi* and the causative agent of human granulocytic Ehrlichiosis in deer ticks, Delaware. *Emer Infect Dis*, 6, 408-411.

Daniels, T. J.; Battaly, G. R.; Liveris, D.; Falco, R.C. and Schwatz, I. 2000. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis?. *Emer Infect Dis*, 8, 1524-1525.

Dobbenburgh, A.; Van Dam, A.P. and Friking, E. 1999. Human granulocytic Ehrlichiosis in Western Europe. *New Engl J Med*, 340, 1214-1216.

Dumler, J.S. 1999. The Ehrlichiosis: an overview. *Infect Dis Rev*, 1, 110-112.

Dumler, J.S. and Walker, D.H. 2001. Tick-borne Ehrlichiosis. Lancet Infec Dis, April 2001, 21-28.

Dumler, J.S.; Dotevall, L.; Gustafson, R. and Granström, M. 1997. A population-based seroepidemiolic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J Infect Dis*, 175, 720-722.

Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dash, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisha, Y. and Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila. Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 6), 2145-2165.

Euzeby, J.P. 2005. Dictionaonnaire de Bacteriologie Vétérinaire. http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html.

Ewing, S.A.; Dawson, J.E.; Kocan, A.A.; Barker, R.W.; Warner, C.K.; Panciera, R.J.; Fox, R.G.; Kocan, K.M. and Blouin, E.F. 1995. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 32, 368-374.

Ewing, S.A.; Dawson, J.E.; Mathew, J.S.; Barker, R.W.; Pratt, K.W. and Telford, S.R 1997. Attempted transmission of human granulocytic ehrlichia (HGE) by *Amblyomma maculatum*. *Vet Parasitol*, 70, 183-190.

Favia, G.; Cancrini, G.; Carfi, A.; Grazioli, D.; Lillini, E. and Iori, A. 2001. Molecular identification of *Borrelia valaisisana* and HGE-Like Ehrlichia in *Ixodes ricinus* ticks in north-estern Italy: first report in Veneto region. *Parassitologia*, 43, 143-146.

Fernández-Soto, P. 2003. Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca. España.

Fernández-Soto, P.; Pérez-Sánchez, R. and Encinas-Grandes, A. 2001. Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) captured in Spain. *J Parasitol*, 87, 1482-1483.

Fingerle, V.; Goodman, J.L.; Johnson, R.C.; Kurti, T.J.; Munderloh, U.G. and Wilske, B. 1999a. Epidemiological aspects of human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany. *Wien Klin Wochensch*, 111, 1000-1004.

Fingerle, V.; Munderloch, U.G.; Liegl, G. and Wilske, B. 1999b. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol*, 188, 145-149.

Foggie, A. 1951. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J Pathol Bacteriol*, 63, 1-15.

Foggie, A. 1962. Studies on tick pyraemia and tick-borne fever. *Symposium of the Zoological Society of London*, 6, 51-58.

Garrity, G.M.; Bell, J.A. and Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition.; Release 5.0.; Springer-Verlag, New York, USA.

Gordon, W.S.; Brownlee, A.; Wilson, D.R. and Mcleod, J. 1932. Tick-borne fever. *J Comp Pathol*, 45, 301-302.

Grzeszczuk, A. Stanczak, J. and Kubica-Biernat, B. 2002. Serological and molecular evidence of human granulocytic Ehrlichiosis focus in the Bialowieza forest (Puszcza Bialowieska), northestern Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 21, 6-11.

Gustafson, R. and Artursson, K. 1999. Ehrlichiosis is common among animals but can also occur in humans. *Lakartidningen*, 96, 3884-3887.

Hardalo, C.J.; Quagliarello, V. and Dumler, J.S. 1995) Human granulocitic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. *Clin Infect Dis*, 21, 910-914.

Hulinska, D.; Kurzova, D.; Drevova, H. and Votypka, J. 2001. First detection of Ehrlichiosis detected serologically and with the polymerase chain reaction in patients with borreliosis in the Czech Republic. *Cas Lek Cesk* (abstract), 140, 181-184.

Hunfeld, K.P. and Brade, V. 1999. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, 221-224.

Jenkins, A.; Kristiansen, B.E.; Allum, A.G.; Aakre, R.K.; Strand, L.; Kleveland, D.J.; Van De Pol, I. and Schouls, L. 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes ticks* from southern Norway. *J Clin Microbiol*, 39, 3666-3671.

Juste, R.A.; García-Pérez, A.L. and Povedano-Fernández, I. 1986. Estudio experimental de algunos agentes

patógenos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Theileria*, *Cytoecetes* y *Anaplasma*) en ovejas del País Vasco. *Med Vet*, 3, 431-439.

Juste, R.A.; Scott, G.R.; Pastón, E.; Gelabert , J.L. and Jimenez, S. 1989. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. *Vet Rec*, 124, 636-640.

Keysari, A.; Amram, L.; Keren, G.; Sthoegen, Z.; Potasman, I.; Jacob, A.; Strenger, C.; Dawson, J.E. and Warner, T. 1999. Serologic evidence oh human monocytic and granulocytic ehrlichiosis in Isarael. *Emer Infect Dis*, 5, 775-778.

Kramer, V.L.; Randolph, M.P.; Hui, L.T.; Irwin, W.E.; Gutierrez, A.G. and Vugia, D.J. 1999. Detection of the agents of human ehrlichioses in ixodid ticks from California. Am *J Trop Med Hyg*, 60, 62-65.

Lebech, A.M. Hansen, K.; Pancholi, P.; Sloan, M.L.; Magera, J.M. and Persing, D.H. 1998. Immunoserologic evidence of human granulocytic Ehrlichiosis in danish patients with Lyme neuroborreliosis. *Scan J Infect Dis*, 30, 173-176.

Lepidi, H.; Burnnell, J.E.; Martin, M.E. Madigan, J.E.; Stuen, S. and Dumler, J.S. 2000. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am J Trop Med Hyg*, 62, 29-37.

Leutenegger, C.M.; Pusterla, N.; Mislin, C.N.; Weber, R. and Luzt, H. 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 37, 3390-3391.

Levin, M.L. and Fish, D. 2000a. Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. *Infect Immun*, 68, 2183-2186.

Levin, M.L. and Fish, D. 2000b. Immunity reduces reservoir host competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. *Infect Immun*, 68, 1514-1518.

Levin, M.L.; Des Vinges, F. and Fish, D. 1999. Disparity in the natural cycles of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic Ehrlichiosis. *Emer Infect Dis*, 5, 204-208.

Lewis, G.E.; Huxsoll, D.L.; Ristic, M. and Johnson, A.J. 1975. Experimentally induced infection of dogs, cats and non-human primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am J Vet Res*, 36, 85-88.

Liz, J.S.; Anderes, L.; Sumner, J.W.; Massung, R.L.; Gern, L.; Routi, B. and Brossard, M. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol*, 38, 1002-1007.

Liz, J.S.; Sumner, J.W.; Pfister, K. and Brossard, M. 2002. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). *J Clin Microbiol*, 40, 892-897.

Lotric-Furlan, S.; Petrovec, M.; Zupanc, T.A.; Nicholson, W.L.; Sumner, J.W.; Childs, J.E. and Strle, F. 1998a. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis*, 27, 424-428.

Lotric-Furlan, S.; Petrovec, M.; Zupanc, T.A.; Nicholson, W.L.; Sumner, J.W.; Childs, J.E. and Strle, F. 1998b. Human Ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin Wochenschr*, 110, 984-897.

Lotric-Furlan, S.; Zupanc, T.A.; Petrovec, M.; Nicholson, W.L.; Sumner, J.W.; Childs, J.E. and Strle, F. 2001. Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic Ehrlichiosis in Slovenia. *Clin Diag Lab Immunol*, 8, 899-903.

Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Stafford, K.C. and Dumler, J.S. 1997. Antibodies to multiple tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis and Lyme disease in white-footed mice. *J Wildlife Dis*, 33: 466-473.

McQuiston, J.H.; Paddock, C.D.; Holman, R.C. and Childs, J.E. 1999. The human Ehrlichiosis in the United States. *Emerg Infec Dis*, 5, 635-642.

Missic-Majerus, L.J.; Madjaric, V.; Janes-Poje, V. 2000. First description of the human granulocytic ehrlichiosis in Croatia. *Clin Microbiol Infect*, 6(S1), 194-195.

Mitchell, P.D.; Reed, K.D. and Hofkes, J.M. 1996. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti* and human granulocytic Ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol*, 34, 724-727.

Nadelman, R.B.; Horowitz, H.W.; Hsieh, T.C.; Wu, J.M.; Aguero-Rosenfeld, M.E.; Schwartz, I.; Nowakowsky, J.; Varde, S. and Wormser, G.P. 1997. Simultaneous human granolocytic Ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *New Engl J Med*, 337, 27-30.

Nuti, M.S.; Serfini, D.A.; Bassetti, D.; Ghionni, A.; Russino, F.; Rombola, P.; Macri, G. and Lillini, E. 1998. Ehrlichia infection in Italy. *Emer Infect Dis*, 4, 663-665.

Ogden, N.H.; Bown, K.; Horrocks, B.K.; Woldehiwiet, Z. and Bennet, M. 1998. Granulocytic erhrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the UK. *Med Vet Entomol*, 12, 423-429.

Ogden, N.H.; Casey, A.N.J.; French, N.P. and Woldehiwet, Z. 2002a. Field evidence for density-dependent facilitation amongst *Ixodes ricinus* ticks feeding on sheep. *Parasitology*, 124, 117-125.

Ogden, N.H.; Casey, A.N.J.; French, N.P.; Bown, K.J.; Adams, J.D. and Woldehiwet, Z. 2002b. Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheeps "carriers" to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitology*, 124, 127-136.

Olano, J.P. and Walker, D.H. 2002. Human Ehrlichiosis. *Med Clin North Am*, 86, 375-392.

Olmeda, A.S.; Toledo, A.; Casado-Nistal, M.A.; Valcárcel, F.; García Esteban, C.; Jado, I.; Escudero, R. and Anda, P. 2005. Seasonal activity of ticks and tick-borne pathogens in central Spain. Book of Abstracts of the 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Logroño, Spain, P-211.

Oporto, B.; Gil, H.; Barral, M.; Hurtado, A.; Juste, R.A. and García-Perez, A. 2003. A survey on Anaplasma phagocytophila in wild small mammals and roe deer (Capreolus capreolus) in northern Spain. *Ann N Y Acad Sci*, 990,98-102.

Oteo, J.A. and Blanco, J.R. 1999. Ehrlichiosis granulocítica humana. ¿Una zoonosis emergente en nuestro medio?. *Enfer Infec Microbiol Clin*, 17, 267-268.

Oteo, J.A. and Brouqui, P. 2005. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enfer Infecc Microbiol Clin*, 23, 375-380.

Oteo, J.A.; Blanco, J.R.; Martínez De Artola, V. and Ibarra, V. 2000. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europa (Spain). *Emer Infect Dis*, 6, 430-432.

Oteo, J.A.; Gil, H.; Barral, M.; Pérez, A.; Jiménez, S.; Blanco, J.r.; Martínez de Artola, V.; García-Pérez, A and Juste, R.A. 2001. Presence of granulocytic *Ehrlichia* in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect*, 127, 353-358.

Pancholi, P.; Kolbert, C.P.; Mitchell, P.D.; Reed, K.D.; Dumler, J.S.; Bakken, J.S.; Telford, s.R. and Persing, D.h. 1995. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic Ehrlichiosis. *J Infect Dis*, 172, 1007-1012.

Parola, P. 2004. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 297-304.

Parola, P.; Beati, L.; Cambon, M.; Brouqui, P. and Raoult, D. 1998. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *J Med Entomol*, 35, 180-183.

Pérez, M. Rikihisa, Y. and Wen, B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol*, 34, 2133-2139.

Petrovec, M.; Lotric-Furlan, S.; Zupanc, T.A.; Strle, F.; Brouqi, P. and Roux, V. 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol*, 35, 1556-1559.

Petrovec, M.; Sumner, J.W.; Nicholson, W.L.; Childs, J.E.; Strle, F.; Barlic, J.; Lotric-Furlan, S. and Avsic-Zupanc, T. 1999. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic Ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol*, 37, 209-210.

Popov, V.L.; Han, V.C.; Chen, S.M.; Dumler, S.J.; Feng, H.M.; Andreadis, T.G.; Tesh, R.B. and Walker, D.H. 1988. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol*, 47, 235-251.

Portillo, A.; Santos, A.S.; Santibáñez, S.; Blanco, J.R.; Ibarra, V.; Bacellar, F. 2004. Detección de variantes no patógenas de *Anaplasma phagocytophilum* en *Ixodes ricinus* de la península Ibérica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22, 151-153.

Pusterla, N.; Weber, R.; Wolfensberger, C.; Schar, G.; Zbinden, R.; Fierzt, W.; Madigan, J.E.; Dumler, J.S. and Lutz, H. 1998. Serological evidence of human granulocytic Ehrlichiosis in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17, 207-209.

Pusterla, N.; Leutenegger, C.M.; Huder, J.B.; Weber, R.; Baum, U. and Lutz, H. 1999. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 37, 1332-1334.

Remy, V.; Hansman, Y.; De Martino, S.; Christmann, D. and Brouqui, P. 2003. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitys in France. *Clin Infect Dis*, 37, 846-848.

Richter, P.J.J.; Kimsey, R.B.; Madigan, J.E.; Barlough, J.E.; Dumler, J.S. and Brooks, D.L. 1996. *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichiae). *J Med Entomol*, 33, 1-5.

Rikihisa, Y. 1999. Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffensis*. *Microb Infect*, 1, 367-376.

Ruscio, M. and Cinco, M. 2003. Human granulocytic ehrlichiosis in Italy: first report on two confirmed cases. *Ann NY Acad Sci*, 990, 350-352.

Semenov, A.V.; Alekseev, A.N.; Dubinina, E.V.; Kaufman, U. and Jensen, R.N. 2001. Detection of the genotypic heterogeneity of *Ixodes persulcatus* Schulze (Acari: Ixodidae) of the North-West region of Russia and characteristics of distribution of tick-borne pathogens cuasing Lyme disease and Ehrlichia infections in various genotypes. *Med Parazitol Mosk*, Jul-Sep 3, 11-5.

Skarphedinsson, S.; Sogaard, P. and Pedersen, C. 2001. Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis in high-risk groups in Denmark. *Scan J Infect Dis*, 33, 206-210.

Stannard, A.A.; Gribble, D.H. and Smith, R.S. 1969. Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to Tick-borne fever and bovine petechial fever. *Vet Rec*, 110, 149-151.

Strle, F. 2004. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol*, 293, suppl 37, 27-35.

Schwartz, I.; Fish, D. and Daniel, T.J. 1997. Prevalence of the rickettsial agent of human granulocytic ehrlichiosis in ticks from a hyperendemic focus of Lyme disease. *New Engl J Med*, 337, 49-50.

Thomas, D.R.; Sillis, M.; Coleman, T.J.; Kench, S.M.; Ogden, N.H.; Salmon, R.L.; Morgan-Capner, P.; Softly, P. and Meadows, D. 1998. Low rates of Ehrlichiosis and Lyme borreliosis in english farmworkers. *Epidemiol Infect*, 121, 609-614.

Tylewska, S.W.; Chmielewki, T.; Kondrusik, M.; Hermanowska-Szpakowicz T.; Sawicki, W.; Sulek, K. 2001. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20, 196-198.

Weber, R.; Pusterla, N.; Loy, M.; Leutenegger, G.M.; Schar, G.; Baumann, D.; Wolfensberger, G. and Lutz, H. 2000. Serologic and clinical evidence for endemic occurrences of human granulocytic Ehrlichiosis in North-eastern Switzerland. *Schweiz Med Wochenschr*, 14, 1462-1470.

Woessner, R.; Gaertner, B.C.; Grauer, M.T.; Weber, K.; Mueller-Lantzsch, M.; Hundfeld, K.P. and Treib, J. 2001. Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection*, 29, 271-273.

Zeidner, N.S.; Burkot, T.R.; Massung, R.; Nicholson, W.L.; Dolan, M.C.; Rutherford, J.S.; Biggerstaff, B.J. and Maupin, G.O. 2000. Transmission of the agent of human granulocytic Ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. *J Infect Dis*, 182, 616-619.

Zeman, P.; Pazdiora, P.; Rebl, K. and Cinalt, J. 2002. Antibodies to granulocytic ehrlichiae in the population of the western and central part of the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 51, 13-8.