

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

Centro Regional de Investigación en Salud Pública

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON
ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR.

TÍTULO:

*IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE GARRAPATAS Y DETECCIÓN DE INFECCIONES
NATURALES POR RICKETTSIOSIS EN EL SUR DE CHIAPAS.*

Presenta: QFB Noe López López

COMITÉ DE TESIS:

Director: Dr. Armando Ulloa García (CRISP).

Asesor: Dr. Jorge Aurelio Torres Monzón (CRISP).

Asesor: M. C. Sergio E. Bermúdez Castillero (Panamá).

TAPACHULA, CHIAPAS, FEBRERO DEL 2014.

Índice.

Dedicatorias

Agradecimientos.

Resumen.

1. Introducción 8
2. Planteamiento del problema.	12
3. Marco Teórico.	13
3.1 Generalidades de las garrapatas.13
3.3 Ciclo de vida de las garrapatas.15
3.4 Transmisión de la Enfermedad16
3.5 Relación del vector y patógenos.18
3.5 Rickettsiosis en el mundo y vectores18
4. Antecedentes en México.21
5. Justificación.22
6. Objetivos.23
6.1 Objetivo general.23
6.2 Objetivos específicos.23
7. Materiales y métodos.24
7.1 Área de estudio.24
7.2 Colección de garrapatas e identificación taxonómica.25
7.3 Detección molecular de Rickettsia sp., en garrapatas.26

7.3.1 Extracción de ADN.26
7.3.2 Ensayo de PCR.26
7.3.3 Identificación de la especie de <i>Rickettsia</i>27
7.4 Análisis de datos.28
8. Resultados.29
8.1 Especies de garrapatas colectadas en el área de estudio.29
8.1.1 Garrapatas colectadas por hospedero29
8.1.2 Identificación morfológica de especies de garrapatas30
8.1.3 Preferencias alimenticias garrapatas por hospedero32
8.2 Determinación de la Infección por <i>Rickettsia</i> sp. en garrapatas.33
8.2.1 Identificación de género <i>Rickettsia</i>33
8.2.2 Identificación de especie de <i>Rickettsia</i>34
8.3 Tasa mínima de infección por <i>Rickettsia typhi</i> por especie de garrapatas.	37
9. Discusión.	38
10. Bibliografía.41

Dedicatorias.

A mis padres Gonzalo y Esthela:

Nunca podré expresar como han logrado motivarme a continuar con mis sueños y a lograr mis propósitos y por extenderme la mano siempre para orientarme que hacer.

A Nayeli Vera Escobar y José Daniel:

Como esposa, siempre has estado conmigo en todo lo que has podido, gracias por tu paciencia, comprensión, por tu bondad y sacrificio. A mi hijo José Daniel porque eres lo más grande y hermoso que Dios me ha regalado y a quien siempre amaré en la vida.

A mis hermanos y hermanas:

Por estar siempre a mi lado motivándome a seguir adelante y por influir con su apoyo moral.

Agradecimientos:

A Dios:

Por ser la herencia que le diste a mis padres y por conducirme siempre en tus preceptos. No puedo encontrar palabras para poder expresar mi gratitud hacia ti.

Dr. Armando Ulloa García:

Por sembrar la inquietud de realizar un tema diferente en este centro de investigación (CRISP) y por confiar en mí para realizarlo. A pesar de tantos obstáculos que se presentaron, fuimos capaces de desarrollar, solventar y concluir nuestros objetivos.

Dr. Mauricio Casas Martínez:

A mi tutor de la Maestría por inculcarme la madurez para lograr uno de los objetivos en la vida y por aconsejarme en diversas situaciones durante este eslabón. Por pertenecer al grupo de Investigadores que nos ayudaban a cuestionar nuestras ideas.

Dr. Jorge Aurelio Torres Monzón:

Además de ser mi asesor, lo consideré un segundo tutor en el CRISP y que siempre me apoyó con lo que estaba a su alcance para desarrollar el proyecto de tesis.

Mtro. Sergio Bermúdez:

Por sus acertados comentarios y sugerencias y, por la fina e inmediata respuesta a nuestras dudas en el tema de tesis.

Dr. J. Guillermo Bond:

Por dedicar tiempo para revisar este escrito, por apoyarnos con sus comentarios y sugerencias.

Dr. Rogelio Danis Lozano:

A pesar de que no era su proyecto, siempre estuvo apoyándonos con el combustible para los muestreos de garrapatas.

Don Eufonio:

Por participar en los muestreos en las comunidades, por compartir sus experiencias y además por conducir el transporte del INSP.

A mis profesores:

Por sacrificar su tiempo, por brindar lecciones y experiencias para formarme para cada uno de los retos de la vida profesional.

A los coordinadores de la Maestría:

Dr. José Luis y Dra. Lupita por animarme en momentos críticos y atender mis dudas y por enseñarme que existen alternativas.

A CONACyT.

Por brindarme el apoyo económico durante el periodo 2011-13 e invertir en el campo de la investigación en salud pública y otras disciplinas científicas.

Al CRISP y al INSP.

Por proporcionarme las instalaciones para mi desarrollo profesional, transporte, un aula y por respaldarme con una matrícula.

A mi Patria México:

Por cobijarme como ciudadano y por darme una identidad.

A la Legión Yucateca del Hideyo Noguchi:

Dr. Zavala Castro, Mtra. Karla Dzul, QFB Karina, QFB. Benjamín, Biol. Jorge, Biol. Yovani y a todos los del laboratorio de enfermedades emergentes y reemergentes por apoyarme a la extracción de ADN, PCR y RFLP.

A mis compañeros de grupo:

Por compartir diversas experiencias y sus recuerdos quedaran en mi corazón.

A la población de estudio:

Por darnos permiso de recolectar garrapatas en sus domicilios y apoyarnos a sujetar a sus animalitos, les agradezco, porque sin sus apoyos, esto hubiera más complicado, mil gracias.

Resumen.

Identificación de especies de garrapatas y detección de infecciones naturales por Rickettsiosis en el Sur de Chiapas.

Se realizó una colecta de garrapatas a través de la técnica de arrastre y extracción directa de hospederos animales, humanos y de la vegetación en los municipios de Tapachula, Mazatán, Huehuetán, Huixtla y Acapetahua ubicados en el Sur de Chiapas durante los años 2012-2013. Las especies colectadas fueron *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus (Boophilus) sanguineus* y *Amblyomma mixtum*. Los especímenes fueron agrupados en pooles (1 a 10 garrapatas) y a partir del DNA se amplificaron los genes *gltA* y *htrA* de *Rickettsia* sp. utilizando la técnica de PCR. La determinación de la especie de *Rickettsia* se realizó por medio de RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) con la enzima *AluI*. Los resultados del RFLP indican la presencia de *Rickettsia typhi* en las especies de garrapatas *Rh. sanguineus* y *A. mixtum*. La tasa mínima de infección (TMI) para los pooles positivos a *Rickettsia* fue de 3.88 que indica actividad del patógeno en el área de estudio.

1. Introducción.

Las garrapatas pertenecen a la Clase Arachnida (suborden Ixodida), se dividen en tres familias, conocidas como Argasidae (garrapatas suaves), Ixodidae (garrapatas duras) y Nuttalliellidae (Goddard, 2003). De estas, los Ixodidae se considera el grupo de mayor importancia en la transmisión de patógenos a humanos, ya que se tienen evidencia de que el 80% de la fauna de las garrapatas pertenecen a este grupo (702 especies), seguido de la familia Argasidae (193 especies) y la Nuttalliellidae de la cual solo se conoce una especie en África (Jongean y Uilenberg 2004).

Las garrapatas se consideran el grupo más importantes de vectores de patógenos dentro del phylum Artropoda, siendo comparable solamente a los mosquitos (familia Culicidae) (Hoogstraal 1985). Esta importancia se ve ligada a la diversidad de patógenos que pueden transmitir (Jongean y Uilenberg 2004), lo cual incluye los agentes que provocan distintos tipos de fiebres hemorrágicas, como Crimea-Congo (<http://www.cdc.gov/vhf/crimean-congo/>), Erlichiosis (Telford y Goethert 2004), Anaplasmosis (Cowan 2004), la enfermedad de Lyme (Morales-Betoulle et al, 2006), Babesiosis, Tularemia (CDC 2013) y Rickettsiosis (Parola et al, 2005).

Las *Rickettsiosis* son un grupo de enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia* (bacteria intracelular obligada) (Blair et al, 2004; Todar 2013) y se encuentran ampliamente distribuidas tanto en países tropicales y de clima templado. En Latinoamérica y el Caribe, se tienen registradas un total de 13 especies de *Rickettsiae*, *Rickettsia felis* (9 países), *R. prowazekii* (7 países), *R. typhi* (6 países), *R. rickettsii* (6 países), *R. amblyommii* (5 países) y *R. parkeri* (4 países) (Labruna et al, 2011), de estas se tiene evidencia de que al menos seis especies fueron aisladas de garrapatas y por tanto la distribución de estos patógenos se relaciona con la distribución del vector (Figura 1) (Raoult y Roux, 1997).

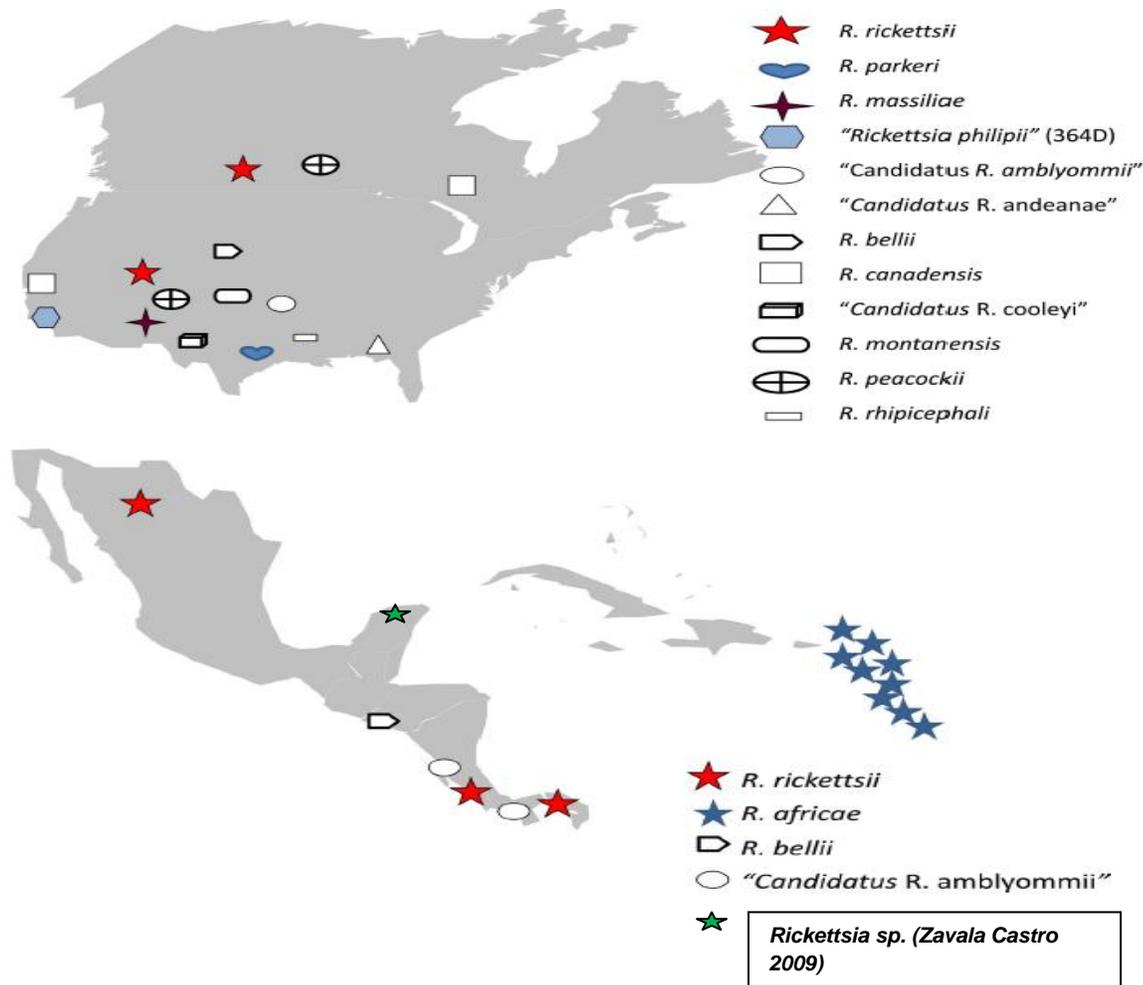


Figura 1. Modificado de Parola et al, 2013. Muestra las especies de Rickettsia reportadas y transmitidas por garrapatas. Los símbolos en blanco se refieren a especies de Rickettsia de patogenicidad desconocida. Adicionalmente se le agregó el dato de la estrella verde que indica reportes de casos humanos confirmados por diversas especies de *Rickettsia* del Grupo de las Fiebres Manchadas y del Grupo Tífus.

Las Rickettsiosis agrupan principalmente bacterias causantes de Fiebres Manchadas y Tíficas. Dentro del primer grupo, destaca *R. rickettsii* agente causal de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), reportada en Canadá, Estados Unidos, México Panamá y Costa Rica (Parola et al, 2013). En Estados Unidos la FMMR, es considerada la más común y fatal para el humano, con un promedio anual de 351 casos (Dalton et al., 1995), sin embargo, este número va en aumento, ya que durante el periodo 2000-2007 se reportaron 11, 531 casos (Parola et al, 2013). Dentro de los principales vectores de esta enfermedad en los Estados Unidos se encuentran *Dermacentor*

andersoni (garrapatas de la madera de las Montañas Rocosas), seguido de *Dermacentor variabilis* (garrapata americana del perro), *Amblyomma mixtum* s.s. (miembro del complejo *A. cajennense* s.l.) (Beati et al. 2013) y *Rhipicephalus sanguineus* s.l., estas dos últimas especies también se consideran los principales vectores de esta enfermedad en México, Panamá, Colombia y Brasil (Goddard 2003) (ver Figura 2).

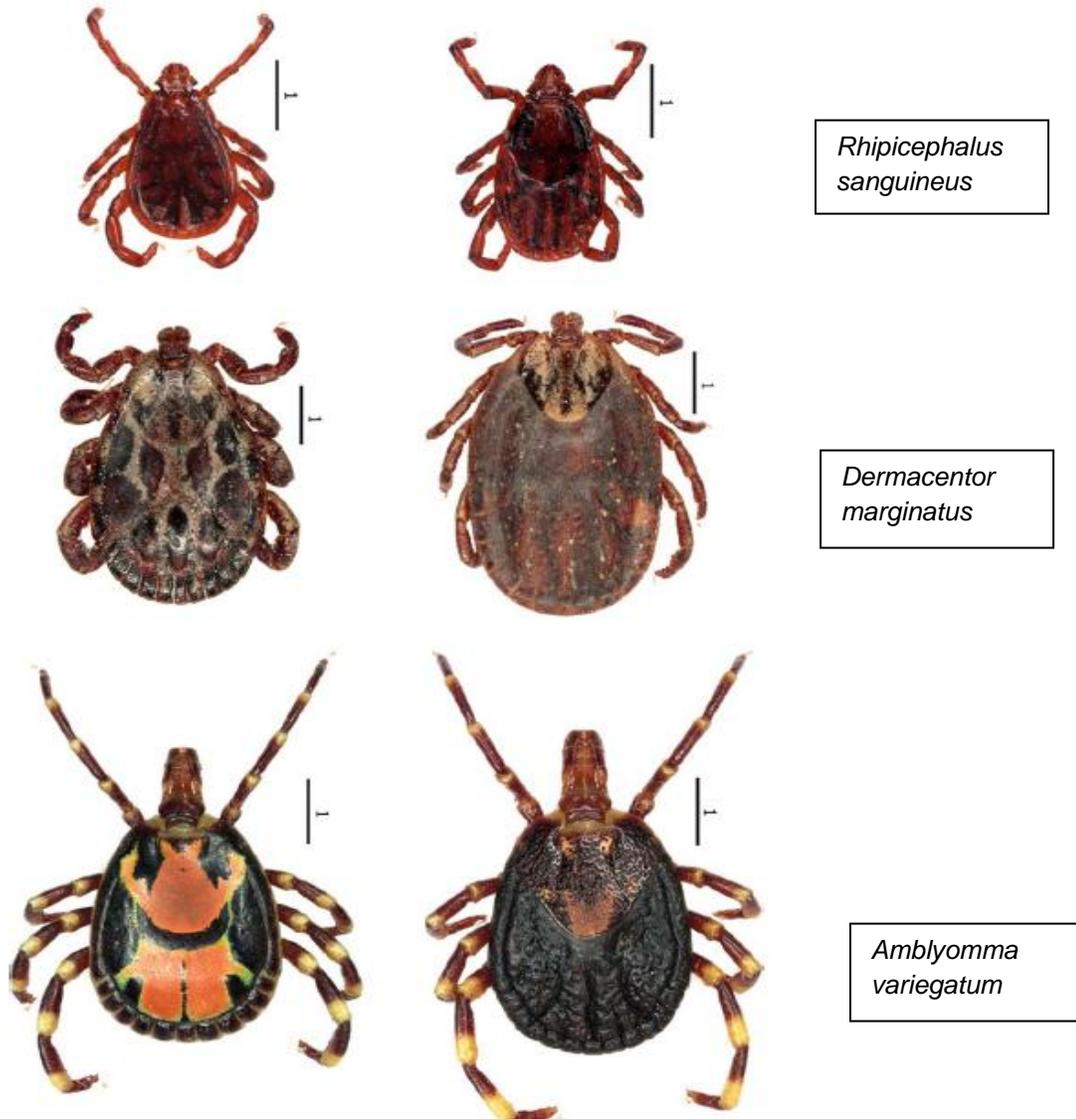


Figura 2. **Especies de garrapatas vectores del Grupo de las Fiebres Manchadas** (Tomado de Parola et al, 2013). *Rhipicephalus sanguineus* considerado el vector principal de la *R. conorii* subsp. *conorii*, el agente de la fiebre maculosa del Mediterráneo. *Dermacentor marginatus*, vector de *R. slovacica* y *R. raoultii* y *Amblyomma variegatum*, vector de *R. africae*, el agente de fiebre africana por picadura de la garrapata (African Tick Borne Fever). Los machos están en el lado izquierdo, y las garrapatas hembra están a la derecha.

Por otro lado, dentro del grupo Tifus, se conocen las enfermedades Tifo epidémico, Tifo endémico, el Tifo de los matorrales, causados por *R. prowazekii*, *R. typhi* y *R. tsutsugamushi* respectivamente. Este conjunto de enfermedades están condicionadas a la pobreza y su principal modo de transmisión es a través de sus vectores principales como piojos, pulgas y ácaros (Calderón Romero 2008).

Las garrapatas, han logrado colonizar nuevos nichos ecológicos con un clima adecuado y hospederos apropiados, lo que significa que se tienen modos eficaces de dispersión (por ejemplo el comercio de ganado bovino, equino; y los movimientos migratorio de animales silvestres que incluye mamíferos y aves) (Daniel y Dusbábek, 1994), este movimiento de poblaciones de garrapatas pueden ser un riesgo epidemiológico ya que estas pueden estar infectadas con patógenos e iniciar el establecimiento del ciclo de transmisión local entre poblaciones locales de garrapatas y hospederos.

2. Planteamiento del problema.

Las enfermedades zoonóticas son causadas por muchos agentes patógenos. En algunos casos, los humanos son hospederos accidentales de una enfermedad que ecológicamente es mantenida por hospederos animales, incluyendo insectos y otros artrópodos (Kayali et al, 2003; Schelling et al, 2003). Debido a la circulación de agentes zoonóticos entre animales, humanos y el medio, el costo de una enfermedad afecta la actividad y la salud humana. De acuerdo al Instituto de Medicina (Institute of Medicine 2009), los patógenos zoonóticos han causado más del 65% de las enfermedades infecciosas emergentes en las últimas seis décadas, con un costo estimado por arriba de los 20 billones de dólares (World Bank 2010).

Las enfermedades transmitidas por garrapatas, han tenido un impacto muy importante en los seres humanos y los animales (<http://www.afpmb.org>). En muchos países templados, los aspectos de la salud humana son de los que más preocupan, mientras que por otra parte en la salud animal (principalmente en el ganado) han tenido inmensas consecuencias económicas en los países tropicales y subtropicales.

En México diversos estudios han reportado la presencia de varias enfermedades en humanos transmitidas por garrapatas, entre ellas se incluyen la enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), en donde por primera vez fueron confirmados serológicamente 9 casos en humanos, distribuidos en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz (por la vertiente del golfo de México), el estado de Jalisco (por el Océano Pacífico) y México D.F., sin tener identificado el vector (Gordillo et al, 1999 y Gordillo-Pérez et al, 2007). De igual forma, otras de las enfermedades que han tenido impacto en la población humana es la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), en el estado de Sonora a partir del año 2002 se observó un incremento de más de 600 casos, lo cual ilustra claramente la importancia médica de dichas infecciones. En este caso se tiene evidencia de que el principal vector es la garrapata café del perro *Rh. sanguineus* (Álvarez Hernández 2010). La presencia de estas enfermedades y vectores confirmados en algunos estados de México, representan un riesgo inminente para los estados en los que no se tienen evidencia de su presencia. Factores como la migración de hospederos y la dispersión de vectores puede ser una forma de introducción de nuevos patógenos y vectores, a dichas áreas. En Chiapas, no hay evidencia de la presencia de casos de alguna enfermedad transmitida por garrapatas, por lo que el propósito de este estudio fue

identificar las especies de garrapatas presentes y si alguna de ellas son reservorios de alguna especie de *Rickettsia* que pudiera estar circulando en la región.

3. Marco Teórico.

3.1 Generalidades de las garrapatas.

Las garrapatas, junto con otros invertebrados tales como insectos, arañas, ácaros y crustáceos, pertenecen al Phylum Arthropoda, el cual se divide en dos subphylum: Mandibulata y Chelicerata. Las garrapatas pertenecen a la Clase Arachnida (dentro del subphylum Chelicerata). Carecen de antenas, tienen cabeza y tórax fusionados y cuatro pares de patas, al igual que las arañas y escorpiones, con excepción de las larvas, que presentan tres pares de patas. La Clase Arachnida agrupa al Orden Acari y dentro de éste al suborden Ixodida al que pertenecen las garrapatas que se diferencian de los demás ácaros en que presentan hipostoma dentado y una estructura quimiorreceptora en el primer par de patas denominada órgano de Haller (Barros-Battesti et al, 2006).

Las garrapatas se parecen a las arañas (orden Araneae), ambos grupos tienen ausente segmentación abdominal visible. Sin embargo, en las arañas las partes bucales están insertadas anteriormente sobre una estructura llamada cefalotórax (o prosoma), que comprende la fusión de la cabeza y el tórax. Las patas también están insertadas sobre el cefalotórax, el cual se conecta al abdomen por un estrecho pedicelo. Contrariamente, las partes bucales de las garrapatas forman un discreto gnatosoma o capitulum en la parte anterior (la "cabeza"), y parte del cuerpo sobre el cual se insertan las patas (el podosoma) está ampliamente unido a la porción del cuerpo más allá de las patas (el opistosoma) para formar el idiosoma (el "cuerpo" de la garrapata). Estos artrópodos no brincan, no vuelan, ni descienden sobre los árboles, sino que reposan en la vegetación esperando que un hospedero pase y literalmente se prendan sobre ellos para alimentarse y en su caso parasitarlos, teniendo mayor actividad a temperaturas altas.

Existen características propias de las tres familias de garrapatas reconocidas en el Mundo. El término "dura" (que se atribuye a la familia Ixodidae) y "suave" (Argasidae) se refieren a la presencia de un escutum dorsal o placa en los Ixodidae, la cual está ausente

en los Argasidae (ver Fig. 3). La familia Argasidae, o garrapatas suaves, contiene cerca de 193 especies distribuidas en el mundo. Mientras que la familia Ixodidae, o garrapatas duras incluyen alrededor de 702 especies. Los ixodidos cuando son adultos, exhiben prominentes dimorfismo sexual: en los machos el escutum cubre todo el dorso, y en las hembras (e inmaduros) el escutum es reducido a pequeñas placas más allá del capitulum, permitiendo de esta manera una gran distensión del tegumento idiosomal durante la alimentación (Sonenshine 1991, Parola y Raoult 2001, Goddard 2003) (Ver Fig. 3A y Fig. 4).

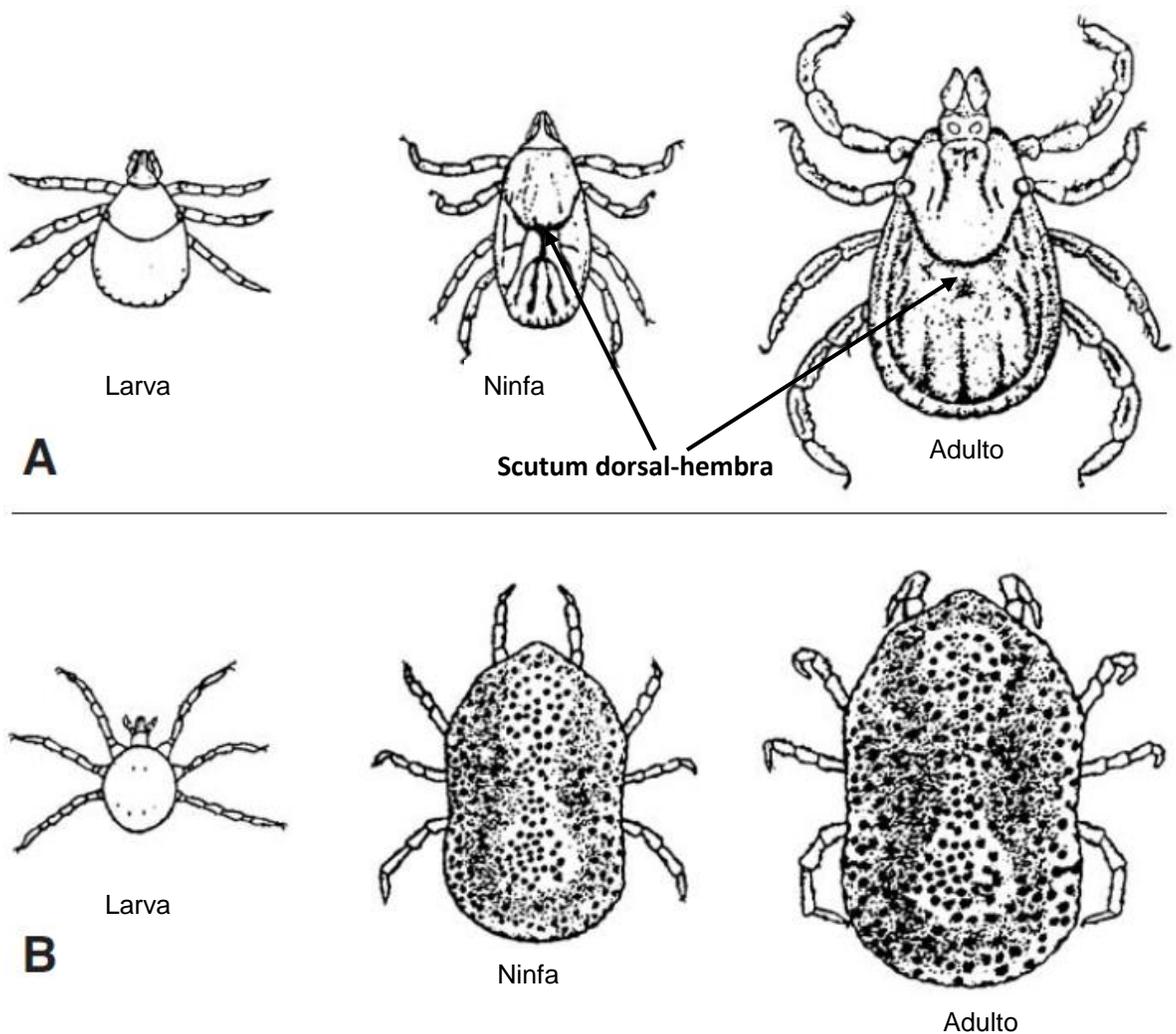


Figura 3. **Etapas de larva, ninfa y adulto de garrapatas duras (A) y suaves (B).** La presencia o ausencia del scutum dorsal (Goddard y Layton, 2006).

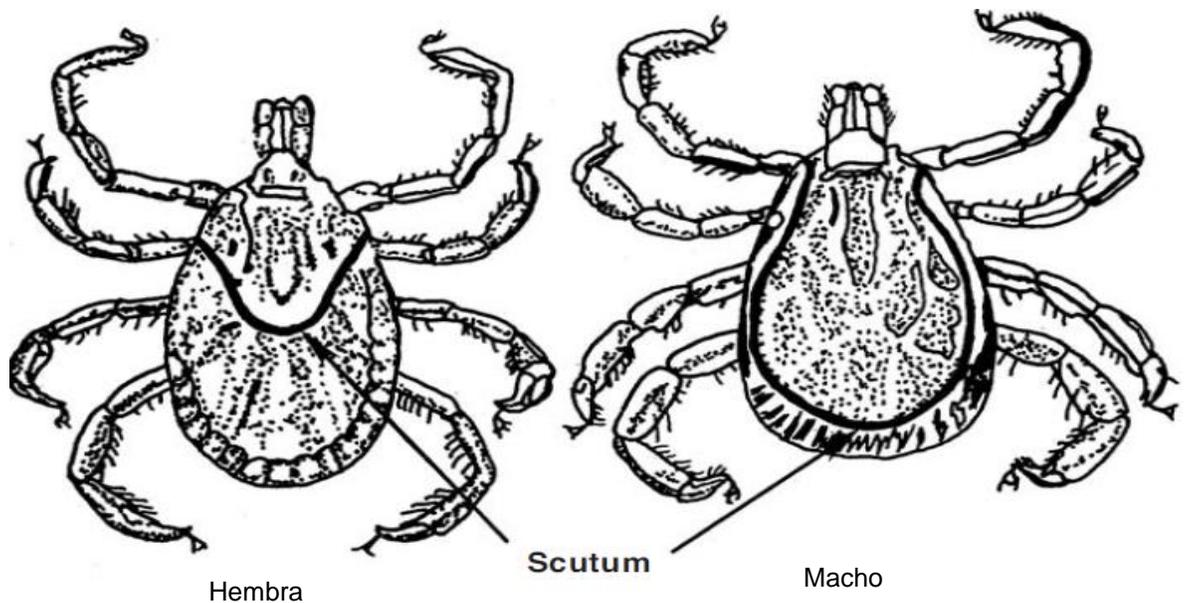


Figura 4. Dimorfismo sexual de las garrapatas duras en su etapa adulta (Goddard y Layton, 2006).

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los hábitats terrestres del planeta, pueden vivir desde el nivel del mar hasta los 2,600 msnm y con fluctuaciones de lluvia de 400 a 2,800 mm anuales (Lima et al, 2000). Normalmente las larvas de garrapatas trepan a las plantas de los pastizales para facilitar el acceso a los hospederos moviéndose horizontalmente hasta 1.8 metros de su sitio original (Falco y Fish, 1991). La distribución geográfica de muchas especies de garrapatas está condicionada a factores ambientales como la temperatura, humedad, tipo de vegetación y disponibilidad de hospederos (Castro y Wright, 2007).

3.2 Ciclo de vida de las garrapatas.

Las garrapatas son artrópodos hemimetábolos y presentan cuatro etapas de vida: huevo, larva, ninfa y adulto. De los huevos eclosiona una larva con 3 pares de patas, la cual necesitará alimentarse entre una o tres veces según sea la especie y pasar de inmediato al estado de ninfa donde cada espécimen ya cuenta con 4 pares de patas. Esta ninfa continúa alimentándose y se transforman en un adulto (ver Fig. 5). La hembra requiere de una alimentación sanguínea para desarrollar huevos (Sonenshine 1991).

Debido a que las garrapatas son ectoparásitos obligados, necesitan alimentarse de sangre para completar su desarrollo y presentan ciclo de vida muy complejo, presentando

una fase parasitaria de alimentación sanguínea y una fase de vida libre (Boero, 1957; Gatto Brito et al, 2006). Dentro de los cuatro estados, los huevos se considera una etapa inactiva y las otras tres etapas son activas ya que parasitan a mamíferos (Gatto Brito et al, 2006, Barros-Battesti et al, 2006). En contraste, las garrapatas de la familia Argasidae pueden pasar por varios estadios ninfales antes de alcanzar la fase adulta y las etapas de alimentación pueden ser muy cortas (de minutos a horas). Los requerimientos de hábitat son un aspecto importante en la biología de garrapatas y afectan los estados no parasíticos así como la oportunidad de contacto con un hospedero para la ingesta de sangre (Oliver 1989).

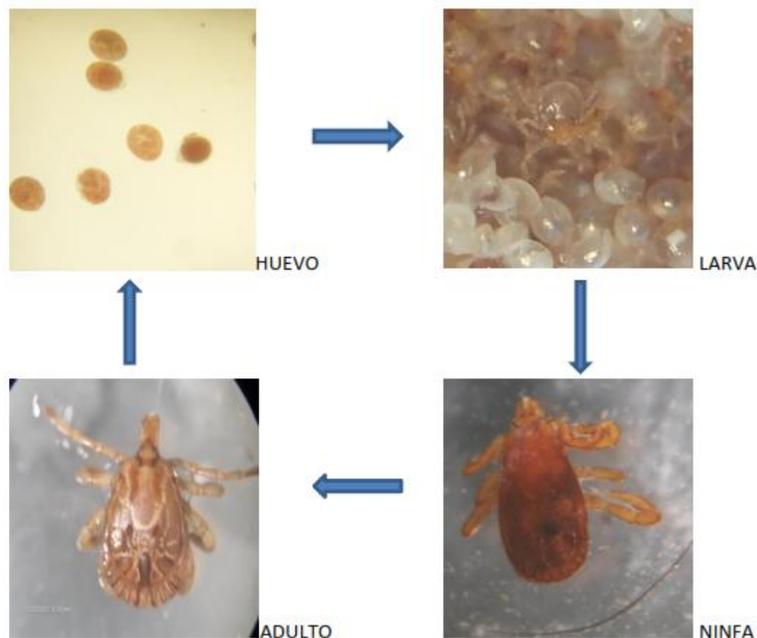


Figura 5. Ciclo de vida de Ixodidae.

3.3 Transmisión de la enfermedad.

Algunas especies de garrapatas aceptan una variedad de especies hospederas, otras son más selectivas y algunas son extremadamente exigentes y se alimentan de una sola especie de hospedero. Las garrapatas son reconocidas por su capacidad de parasitar vertebrados domésticos, silvestres y al hombre, lo cual puede resultar en problemas sanitarios para sus hospederos (Guglielmone et al, 2003), lo cual implica la transmisión de algún agente patógeno (CDC 2013) (ver Fig. 6).

Por ejemplo, durante el ciclo de vida de *Ixodes scapularis*, comúnmente conocida como garrapata de pata negra, *I. scapularis* tiene la capacidad de transmitir Anaplasmosis, Babesiosis y Enfermedad de Lyme y estacionalmente el riesgo de infección al humano es al final de la primavera y el verano (http://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html).

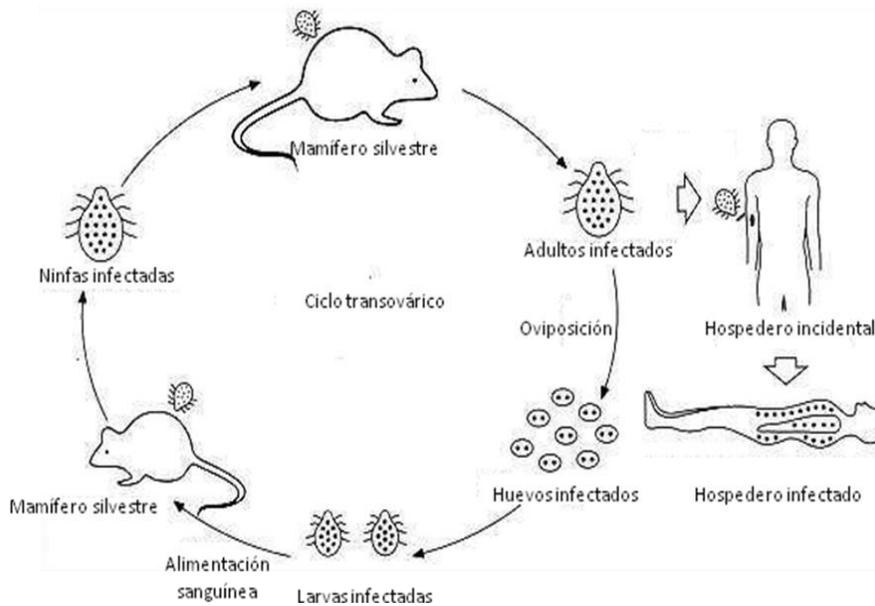


Figura 6. Ciclo de vida de las garrapatas y asociación con el ciclo transovárico de *R. rickettsi*. Tomado de:

<http://www.bio.davidson.edu/people/sosarafova/assets/bio307/liwoeste/PathogenLifeCycle.html>.

3.4 Relación del vector y patógenos.

Previamente se introdujo el concepto de “simbiosis” entre garrapatas y especies de *Rickettsia* e incluso algunos autores denominan a los vectores como reservorios de *Rickettsia sp.* (Parola et al, 2005). A pesar de que se ha comprobado para pocas especies de garrapatas y para pocas especies de *Rickettsia*, el término simbiosis se debe en gran medida a que algunos autores reportan una *transmisión transestadial*, es decir, el patógeno se transmite de un etapa de desarrollo a otro (Parola y Raoult, 2001); otros describen una *transmisión transovárica* (Rehacek, 1984), sin embargo, ambos tipos de transmisión han sido demostrados en especies tales como *R. rickettsii*, *R. slovaca*, *R. sibirica*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, y *R. conorii* (Socolovschi et al, 2009). En este sentido hay que aclarar que la mayoría de los estudios se concentran en estudiar el rol vectorial de las garrapatas y dejando en poca atención la relación entre *Rickettsia* y las células, tejidos y órganos de las garrapatas. Además, estudios *in vitro* arrojaron resultados cuestionables para la transmisión vertical de *R. conorii conorii* en *Rh. sanguineus* debido al origen geográfico de la garrapatas y métodos de inoculación. Sin embargo, en garrapatas infectadas naturalmente, puede existir una transmisión del patógeno de manera efectiva a la progenie (Parola et al, 2013).

3.5 Rickettsiosis en el mundo y vectores.

Los miembros del género *Rickettsia* (familia: *Rickettsiaceae*; orden: *Rickettsiales*) se clasifican en: 1) RGFM, RGT, Grupo de *Rickettsia bellii* y el Grupo de *R. canadensis* (Merhej y Raoult 2011). En el primer grupo de Rickettsiosis, incluye aproximadamente 15 rickettsiosis transmitidas por garrapatas, entre ellas podemos incluir a las enfermedades provocadas por *R. rickettsii*, *R. conorii*, entre otras (Parola y Raoult 2001). Entre las RGT más conocidas se encuentran el *tifo epidémico*, que es causado por *R. prowazekii* (transmitido por el piojo del cuerpo *Pediculus humanus corporis*) y su distribución se encuentra en regiones montañosas de México, América Central y Sur, Asia y África. Otra enfermedad del grupo tifo (tifus) es el *tifo endémico*, causado por *Rickettsia typhi* y su principal vector es la pulga *Xenopsylla cheopis* y el reservorio más importante es la rata (*Rattus norvegicus* o *R. rattus*) (Calderón-Romero 2008).

Las primeras investigaciones en el siglo XX se llevaron a cabo con el fin de detectar especies de *Rickettsia* del Grupo de las Fiebres Manchadas (RGFM) en garrapatas y fueron aisladas o detectadas en éste ectoparásito. Con estos resultados se consideraron a las bacterias como simbioses, endosimbioses y no patogénicas. Una de las razones para esta caracterización se basó por la limitada patogenicidad probada en animales (Parola et al, 2005). Históricamente, el único patógeno conocido causante de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas y que es transmitido por garrapatas en América fué *R. rickettsii* (Raoult, 2004). La mayoría de los estudios realizados se dedicaron a describir el papel que jugaban las garrapatas en la transmisión de patógenos. En 1906, se identificó a las garrapatas duras como vectores de *Rickettsia* y en esos mismos años se involucró a *D. andersoni* en la transmisión de *R. rickettsii* causante de Fiebre Manchada (Ricketts 1906 y 1909). Más tarde, en los 1930s, se demostró el rol de otras especies de garrapatas como *Rh. sanguineus* incriminadas en la transmisión de *R. conorii* (Blanc y Caminopetros 1932). Otros estudios le atribuyeron a *D. variabilis* y *D. andersoni* la transmisión de *R. rickettsii*, en el este y oeste de los Estados Unidos (Burgdorfer 1975).

Otras especies de *Rickettsia* pertenecientes a las RGFM se detectaron en garrapatas (Raoult y Roux, 1997), pero, fueron consideradas como “no patogénicas” para humanos (Parola et al, 2005). Por ejemplo, *R. parkeri* fué identificado en *Amblyomma maculatum* en 1937 (Parker et al, 1939), sin embargo, aproximadamente 65 años más tarde de su identificación, fué reconocido como patógeno emergente humano (Paddock et al, 2004) y se sospechó que provocó la muerte a un paciente en 1990 (Ralph et al, 1990).

En Estados Unidos de América, se realizaron diferentes estudios para observar la infección por *R. rickettsii* para el vector *D. variabilis* capturado de la vegetación y de hospederos mamíferos en varios estados de EUA, reportándose una prevalencia de infección (PI) entre el 2% al 10% (Burgdorfer 1988, Schriefer 1994 y Azad, 1988). Moncayo et al, 2010, realizó un estudio en garrapatas de diferentes especies y encontró *Rickettsia sp.*, del Grupo de las Fiebres Manchadas en un 32% de las garrapatas adultas y ninfas colectadas de diferentes mamíferos e incluso en humanos, sugiriendo que algunos de los casos reportados de FMMR en Tennessee pueden ser causados por otras especies de *Rickettsia*. Mientras que, Fritzen et al, 2011, realizaron un estudio en dos especies de garrapatas (*D. variabilis* y *A. americanum*) colectadas de perros, animales

silvestres y hospederos humanos y encontraron una prevalencia de infección de 14.3% de *Rickettsia sp.* y un 6.3% para *Ehrlichia sp.*

Se tiene poco conocimiento acerca de la distribución geográfica de las Rickettsiosis en el mundo, tan sólo en los Estados Unidos se desconoce de la epidemiología de la enfermedad causada por *R. parkeri*. El vector principal de *R. parkeri* es *A. maculatum* (garrapata de la costa del Golfo) debido a que se ha reportado infectado de manera natural en varios estados del sureste de la unión americana (Sumner et al, 2007). Sin embargo, hay estudios que reportan la detección de *R. parkeri* en *A. americanum*, misma especie es considerada vector de *R. rickettsii* (Cohen et al, 2009) lo cual abre la posibilidad de la existencia de diversas especies de garrapatas infectadas con especies causantes de Rickettsiosis.

4. Antecedentes de Rickettsiosis en México.

En México existen registros de la Fiebre Manchadas (debido a *R. rickettsii*), así como también Tifus endémico (causado *R. typhi*) y Tifus epidémico (causado por *R. prowazekii*). Para el caso de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas su registro data desde la década de los 40's (Bustamante y Varella 1943, 1947; Mariotte y Bustamante 1944). La importancia de la incriminación de la garrapatas como vectores de patógenos en México se demostró en 1944 en el hallazgo de *Rh. sanguineus* infectado de manera natural y en 1946 cuando se llevo a cabo el aislamiento de *Rickettsia sp.*, en *A. cajennense* (Bustamante y Varella, 1946). Mientras tanto, a través de serología se ha detectado anticuerpos contra *R. rickettsii* en México en pacientes sospechosos a dengue (Zavala-Velázquez et al, 1996). En el 2006, Zavala-Castro et al, detectaron el primer caso humano fatal de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas causado por *R. rickettsii* en Yucatán, mismo lugar donde se registra la muerte de animales domésticos debido a *R. rickettsii* sin la identificación del vector implicado en la transmisión. Dos años más tarde se registraron 8 nuevos casos de Rickettsiosis (Zavala-Castro et al, 2008).

Por otra parte, existen dos registros de Rickettsiosis del grupo del tifo, *el tifus epidémico* (causado por *R. prowazekii*) y transmitido por piojos. En los años 1983-1993 fueron reportados brotes de Rickettsiosis del grupo tifo del tipo epidémico (causado por *R. prowazekii*) en Chiapas (Sistema Nacional de Investigación Epidemiológica 2010). Otro registro, de un estudio retrospectivo realizado en Baja California Norte, detectó 275 casos positivos a *Rickettsia rickettsii* y 3 a *R. prowazekii*, con un 50% del total de defunciones en zonas con marginación de Mexicali (Field Cortazares y, Seijo y Moreno, 2011). En el año 2000, se reportó una prevalencia del 14% de anticuerpos reactivos a *Rickettsia typhi* en adultos donadores de sangre (Acuna-Soto et al, 2000). Además, en 2009 se reportaron más casos de Rickettsiosis en Yucatán debido a *R. typhi* en niñas de tres años de edad con cuadro febril de tres días de duración (Zavala Castro et al, 2009A), *R. akari* en dos pacientes femeninos (Zavala-Castro et al, 2009B). Con respecto a lo anterior, esto indica la presencia de casos, con pocos estudios que demuestran la existencia de uno varios artrópodos transmisores de *Rickettsia sp.* No obstante, en Nuevo León, México, se realizó la detección de *R. prowazekii* (asociado a ser transmitido por piojos *Pediculus humanus corporis*) en garrapatas del género *Amblyomma* colectados en campo (Medina-Sanchez et al, 2005).

5. Justificación.

Una de las razones importantes por lo que se desarrolló el presente estudio, se debe a que en Chiapas no habían antecedentes de patógenos transmitidos por garrapatas, lo cual abre la posibilidad de que los resultados obtenidos sean los primeros que se generen en el área de estudio. Por lo que se realizó un monitoreo de las especies de garrapatas que parasitan animales domésticos y la detección de *Rickettsia sp* a través de un análisis molecular. Se puso énfasis en el perro, debido a que desempeña un importante rol en la transmisión de la infección al hombre al introducir las garrapatas potencialmente infectadas al ambiente humano.

Este estudio, parte del conocimiento de que algunas especies de garrapatas incriminadas como vectores importantes en Estados Unidos, Centro y Sudamérica se distribuyen en ciertas regiones de México, tales como *A. mixtum* [(anteriormente conocida como *A. cajennense* s.l. (Fabricius)], *A. maculatum* (Koch), *Rh. sanguineus* s.l. (Latreille), *C. talaje* (Guerin-Meneville), *O. turicata* (Duges), *I. scapularis* (Say), *D. variabilis* (Say). (Goddard 2003; Goodman et al, 2005).

Existen diversos factores que favorecen el establecimiento de ciclos de transmisión de enfermedades zoonóticas, entre las cuales se encuentran: la globalización, los movimientos poblacionales de personas y animales agropecuarios desde áreas endémicas a áreas no endémicas, el desequilibrio ecológico, el incremento de la población humana y la invasión de áreas naturales por el hombre, entre otras. Se puso particular atención a la dispersión de patógenos que pueden ser diseminados por diversos vectores y causan Rickettsiosis. Sobre esto se tiene evidencia que las aves migratorias juegan un papel importante en la distribución de enfermedades transmitidas por garrapatas cruzando largas distancias y barreras geográficas (Elfving et al, 2010 y Hasle 2013). Por lo tanto, los bosques tropicales del Sur de Chiapas podrían ser la entrada de nuevos vectores, debido a que millones de aves migratorias pertenecientes a más de 100 especies, llegan a la región desde diversas rutas migratorias.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general:

Identificar las especies de garrapatas que infestan animales domésticos y detectar si se encuentran infectadas de manera natural con *Rickettsia sp*, en el Sur de Chiapas.

6.2 Objetivos específicos:

1. Identificar las especies de garrapatas presentes en el área de estudio.
2. Detectar infecciones naturales por *Rickettsia sp*. en cada una de las especies de garrapatas presentes en el área de estudio.
3. Calcular la tasa mínima de infección como un indicador de vigilancia de la prevalencia de infección en la población de garrapatas.

7. Materiales y métodos.

7.1 Área de estudio.

Las colecciones se realizaron en comunidades de cinco municipios que incluyen Tapachula (14°54' N, 92°15'W), Mazatán (14°52' N y 92° 27'W), Huehuetán (15°01'N, 92°23'W), Huixtla (15°08'N y 92° 28'W) y Acapetahua (15°17'N, y 92°41'W), ubicados en el plano costero del Océano Pacífico (Elevación 0-200 m). Dentro del municipio de Tapachula se seleccionaron las comunidades siguientes: La ciudad de Tapachula (área urbana: colonia las Vegas, las Américas y colonia Centro), Ejido 20 de Noviembre (área suburbana), Rancho 6 Hermanos y Nueva Granada; dentro del municipio de Huehuetán fueron las comunidades: Rancho 6 Hermanos, Cantón San José El amate (853 h y 19 msnm), Ejido Guadalupe (1574 h y 170 msnm), Cantón Gibraltar (348 h y 150 msnm) y Cantón el Carmen (112 h y 120 msnm). En el municipio de Mazatán: Ejido San Simón (con 146 habitantes y a 4 msnm) y Emiliano Zapata (114 h y 4 msnm), mientras que en el municipio de Huixtla se incluyeron: Cantón Reforma (2 h y 32 msnm), Cantón San Fernando (97 h y a 10 msnm) y Altamira (La providencia) (194 h y a 10 msnm). En el municipio de Acapetahua: Cantón la Salvación y Rio Arriba (88 h y 10 msnm). El clima en el área es caliente y húmedo, con lluvia todo el año con temperatura que oscilan entre los 27°C a 29.7°C (promedio 28.2° C). La estación de lluvia se presenta entre los meses de mayo a octubre y una estación seca que se extiende de noviembre a abril (García 1973).

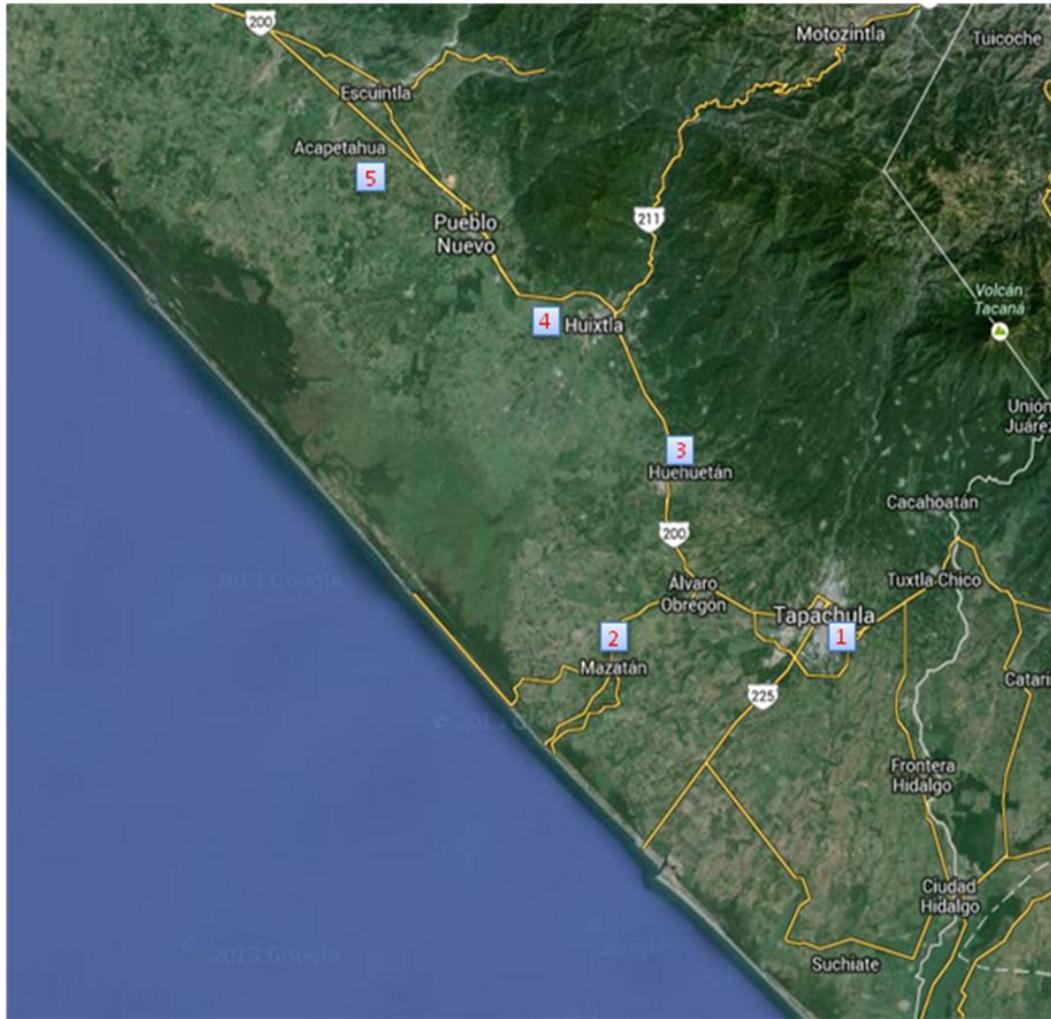


Figura 7. Muestra los 5 Municipios y localidades seleccionadas en este estudio. **1. Tapachula** (a) ciudad) **2. Mazatán** (a) San Simón (b) Emiliano Zapata. **3. Huehuetán** (a) Ejido Guadalupe (b) Cantón Gibraltar (c) El Carmen (d) San José El Amate. **4. Huixtla** (a) Reforma (b) Altamira (c) San Fernando. **5. Acapetahua** (a) Rio Arriba (b) La Salvación.

7.2 Colección de garrapatas e identificación taxonómica.

En cada sitio de muestreo, a cada hospedero seleccionado se le examinó el cuerpo y con la ayuda de una pinza entomológica cada garrapata fue extraída. Las garrapatas colectadas en cada animal fueron depositadas en un vial conteniendo alcohol al 70% y etiquetado con la información de colecta (número de muestra, edad, localidad y fecha). La edad de los animales fue reportada de la información provista por el propietario. En las casas donde se encontraron animales infestados con garrapatas, se les solicitó a las

personas que ellas mismas se revisaran para extraer alguna garrapata que pudieran tener en alguna parte de su cuerpo, asimismo se les solicito su autorización para realizar muestreos en la vegetación alrededor de sus casas. Las muestras de garrapatas colectadas se transportaron al Centro Regional de Investigación en Salud Pública (INSP), Tapachula, Chiapas, donde se realizó la identificación taxonómica usando criterios morfológicos en claves de Goodard y Layton 2006 y Keirans y Litwak 1989, tales como hipostoma, forma dental, palpos (tamaño), coxas, feston (presencia, número y forma) y la especie fue confirmada por nuestro colaborador M. C. Sergio E. Bermúdez Castillero del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud de Panamá. Posterior a la identificación, los especímenes fueron colocados en viales con alcohol (70%) y guardados a -20°C hasta el análisis molecular.

7.3 Detección molecular de *Rickettsia* sp., en garrapatas.

7.3.1 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de las garrapatas (agrupadas de 1 a 10 individuos con la misma clave de colecta) se utilizó el kit Wizard Genomic DNA (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Inicialmente, las garrapatas fueron maceradas en un tubo eppendorf que contenía un volumen de 600 µl de buffer de lisis e incubado a 65°C por 20 minutos y se le adicionó 1µl RNAasa por 5 minutos. Al volumen anterior se le agregó 200 µl de solución precipitante de proteínas y se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf estéril y se le adicionó 600 µl de isopropanol y fue centrifugado nuevamente como se indicó previamente. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo estéril y se le adicionó 600 µl de etanol absoluto y fue centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones para precipitar el ADN. Por último, se descartó el sobrenadante y el ADN obtenido fue rehidratado con la solución rehidratante de ADN (provista en el kit). Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C para su análisis posterior por PCR.

7.3.2 Ensayo de PCR.

Para la detección de los genes *htrA* y *gltA* de *Rickettsia* en las muestras de garrapatas, se empleó la técnica de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) de punto final (Regnery et al, 1991; Williams et al, 1992; Zavala-Castro 2009). En este ensayo se utilizaron un par de primers específicos del gen *gltA* con un tamaño de 381 pb. La secuencia de estos primers fueron RpCS.877p en sentido (5'-GGGGCCTGCTCACGGCGG-3') y RpCS.1258n en antisentido (5'-

ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'). De las muestras que resultaron positivas en la primer PCR, se realizó un siguiente análisis para amplificar el gen *htrA* con un tamaño esperado de 434 pb, usando los primers específicos 17 kDa-1 en sentido (5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3'), y 17kDa-2 en antisentido (5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3') (Santibañez et al, 2013).

En estos dos ensayos por PCR se emplearon 250 ng de ADN, 25 pmol de cada primer (sentido y antisentido), 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 UI de Taq polimerasa platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 5 µl de buffer de PCR 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1.5 µl de cloruro de magnesio 50 mM en una mezcla de reacción de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación del gen *htrA* fueron 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 45 seg a 68°C y 120 seg a 68°C, y al final se incubó a 68°C durante 60 seg. Las condiciones para la amplificación del gen *gltA* fueron 35 ciclos de 94°C 30 seg, 30 seg a 50°C, y 90 seg a 72°C. Ambas condiciones de PCR fueron realizados en un termociclador Techne modelo Genius FGEN02TP (Staffordshire ST15 OSA, UK).

Para verificar el tamaño amplificado por PCR, los productos se corrieron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% a 100 Volts 1 hr e inmediatamente después, los geles se visualizaron utilizando la tinción con bromuro de etidio (0.3 µg/ml) en un transiluminador de luz UV.

7.3.3 Identificación de la especie de *Rickettsia*.

Derivado a que los primers utilizados de los dos genes pueden ser usados para el diagnóstico molecular de *Rickettsia* (Zavala-Castro et al, 2009) en este estudio se usó únicamente el gen *gltA* para ser analizado por RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción). La digestión enzimática se realizó mezclando aproximadamente 1 µg del fragmento de 381 pb correspondiente al gen *gltA*, 1 UI de la enzima *AluI*, 2 µl del buffer L 10x y agua estéril hasta completar un volumen de 20 µl, durante 1 hr a 37 °C. Los productos de la restricción fueron evaluados a través de una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% a 100 volts por 3 horas. Finalmente el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador con luz UV y las imágenes fueron documentadas. Los resultados obtenidos de la restricción fueron

comparados con el patrón control de 4 diferentes especies de *Rickettsia*, que incluyen *R. typhi*, *R. akari*, *R. felis* y *R. rickettsii* (Figura 11B) (Zavala-Castro et al, 2009).

7.4 Análisis de datos.

Se diseñó una base de datos en el programa Excel. Los datos fueron transformados a Log X+1 (para cumplir con el supuesto de una distribución normal de los datos) (Zar 1999). Con este ajuste de los datos se procedió a aplicar un análisis de varianza de una sola vía para detectar posibles diferencias entre las medias del número de garrapatas por tipo de hospedero. Así mismo, se estimó la tasa mínima de infección (TMI) de *Rickettsia sp*, considerando los grupos positivos entre el total de garrapatas, multiplicado por 100. El valor de este indicador indicó la existencia de actividad del patógeno, considerando los siguientes criterios: TMI=0 (no actividad del patógeno); TIM=0.1-3.9 (actividad del patógeno) y TMI> 4 (alta actividad del patógeno) (Steiner et al, 1999).

8. Resultados.

8.1 Especies de garrapatas colectadas en el área de estudio.

Se identificaron un total de 2 géneros representadas en tres especies que incluyen a *Rhipicephalus sanguineus* s.l (Latreille, 1806), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) y *Amblyomma mixtum* s.s. (Fabricius, 1787) (Figura 9). La especie más frecuente fue *Rh. sanguineus* s.l con un total de 345 ejemplares (62.38%; proporción de sexos h:m 0,91:1), seguido de *Rh. (Boophilus) microplus* con 94 (17%; h:m 1:0.36), y *A. mixtum* s.s., 94 (17%; h:m 1:0.8). Un total de 20 ejemplares no se pudieron identificar por la falta de estructuras anatómicas, particularmente el hipostoma (no se incluyeron para los análisis).

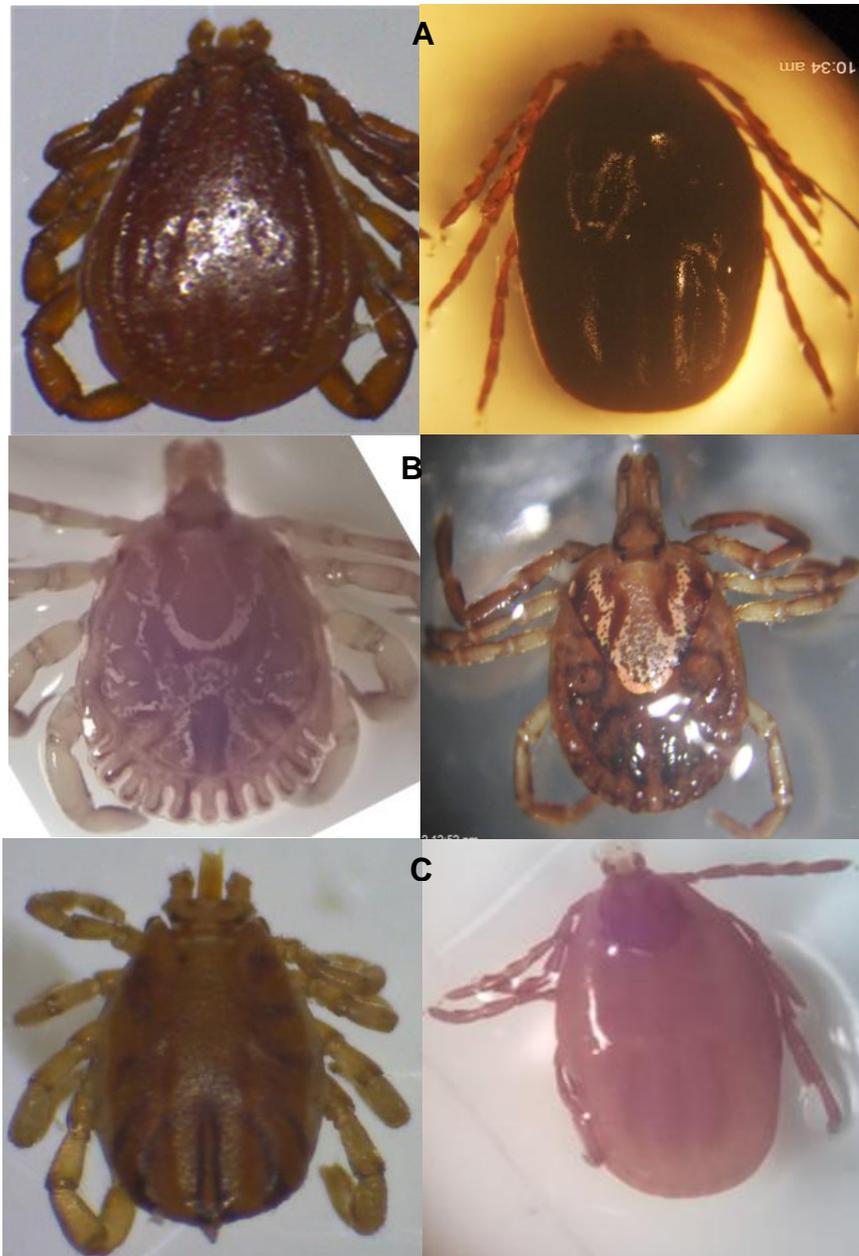


Figura 9. Clasificación de especies de acuerdo con los criterios morfológicos de Goodard y Layton 2006 y Keirans y Litwak 1989. De arriba hacia abajo, A) *Rh. sanguineus* (Macho y hembra). B) *A. mixtum* (Macho y Hembra). C) *Rh. (Boophilus) microplus* (Macho y Hembra).

Tabla 1. Clasificación de garrapatas por especie y sexo, colectadas en diferentes hospederos/sitios.

Sitio de colecta	<i>Rh. sanguineus</i>		<i>Rh. (Boophilus) microplus</i>		<i>Amblyomma mixtum</i>		Indeterminado	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Perros	181	164	4	22	0	1	0	12
Vacas			21	47	0	7	0	2
Caballo					15	33	6	0
Humano					3	16		
Gato					1	1		
Vegetación					5	11		
Pabellón					1	0		
Subtotal	181	164	25	69	25	69	6	14
Total		345		94		94		20

8.2 Número de garrapatas por tipo de hospedero.

De un total de 553 garrapatas, el 93.49% fueron colectadas sobre animales domésticos, 3.43% sobre humanos y 3.07% ejemplares de vida libre (vegetación (16) y pabellón (1)). Entre los animales domésticos muestreados se incluyeron perros (*Canis familiaris*), de donde se colectaron un total de 384 garrapatas ($n=20$; $\bar{x}=19.20 \pm 4.33$), en vacas (*Bos taurus*) 77 ejemplares ($n=3$; $\bar{x}=25.66 \pm 20.16$), caballos (*Equus caballus*) 54 ejemplares ($n=5$; $\bar{x}=10.80 \pm 4.49$) y 2 ejemplar sobre 1 gato (dato que no se consideró en el análisis).

En humanos (*Homo sapiens*) se colectaron un total de 19 ejemplares ($n=6$; $\bar{x}=3.16 \pm 0.98$). El análisis de varianza descarto diferencias significativas entre las medias de las

colecciones por tipo de hospedero ($F=1.80$, $df=3,30$, $p = 0.16$) (Tabla 1).

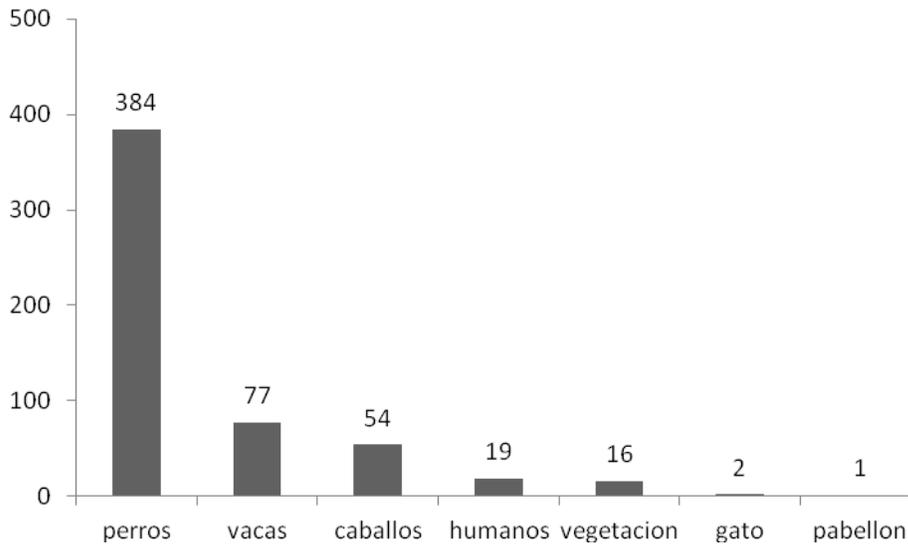


Figura 8. Garrapatas colectadas en diferentes hospederos (animales domésticos y humanos) y de vida libre (vegetación y pabellón).

Tabla 1. Promedio de garrapatas por tipo de hospedero.

Hospedero	N	Media ± error estándar (95% IC)	Estadística
Perros	20	19.20 ± 4.33 (10.12-28.27)	$F=1.80$, $df = 3,30$ $p = 0.16$
Caballos	5	10.80 ± 4.49 (1.69-23.29)	
Vacas	3	25.66 ± 20.16 (61.11-112.44)	
Humanos	6	3.16 ± 0.98 (0.64-5.68)	

8.3 Preferencias alimenticias de garrapatas por hospedero.

A través de los registros de colectas de las garrapatas se pudo determinar el grado de preferencia de hospederos de cada una de las especies, para *Rh. sanguineus* demostró una predilección por perros, ya que el 100 por ciento de los ejemplares fueron colectados sobre este hospedero, de la misma manera *Rh. (Boophilus) microplus* demostró una tendencia en seleccionar al ganado vacuno (72%) pero de manera fortuita se encontró también sobre perros (28%). Finalmente, se observó un hábito alimenticio generalista por la especie *A. mixtum* la cual fue colectado sobre caballos (51.06%), vacas (7.44%), perros (1.06%), gato (2.12) y humanos (20.21%). El resto se consideró de vida libre ya que fueron colectados sobre vegetación (17.02) y un pabellón (1.06).

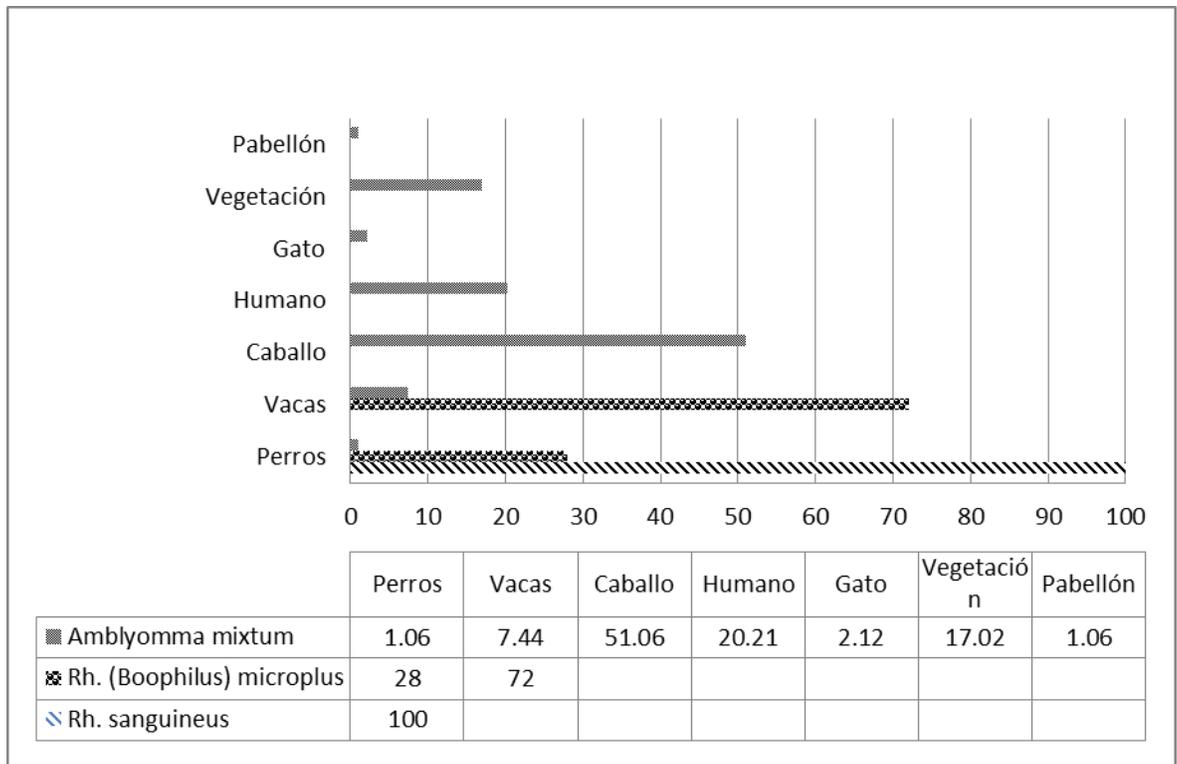


Figura 10. Porcentaje de especies de garrapatas colectadas en diferentes hospederos y de vida libre (vegetación y pabellón).

8.2 Determinación de la Infección por *Rickettsia sp.* en garrapatas.

8.2.1 Identificación de género *Rickettsia*.

Para el análisis molecular se seleccionaron 180 especímenes (n=33%), de ellos se conformaron un total de 39 grupos que contenían de 1 a 10 garrapatas. De estos, 29 grupos (n= 121) fueron *Rh. sanguineus* colectados de perros; otros 6 grupos (n=35) fueron *Rh. (Boophilus) microplus* colectados en 4 vacas y 2 perros, respectivamente; y finalmente 4 grupos (n= 23) de *A. mixtum* colectados en caballo (1 grupo), vaca (1 grupo) y humanos (2 grupos), respectivamente.

Los 39 grupos fueron analizados mediante una Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR), de estos solo 10 grupos amplificaron para el fragmento de 381 pb del gen que codifica para la proteína de *gltA* (Figura 10 A y B). El 70% (7/10) de estos grupos fueron de la especie *Rh. sanguineus* (Figura 10A: muestra 7, y Figura 10B: muestras 6, 9, 12, 14, 16,15); y de *A. mixtum* el 30% (3/10) (Figura 10 A: muestra 8, 11 y 17). Estas siete muestras también fueron sometidas a otro ensayo de PCR buscando la amplificación del fragmento de 434 pb del gen *htrA*, los cuales también resultaron positivos (tabla 3). Con estos dos ensayos se sugirió la detección de infecciones naturales por *Rickettsia sp.*, para lo cual fue necesario confirmar la especie de este patógeno, usando un ensayo con RFLP.

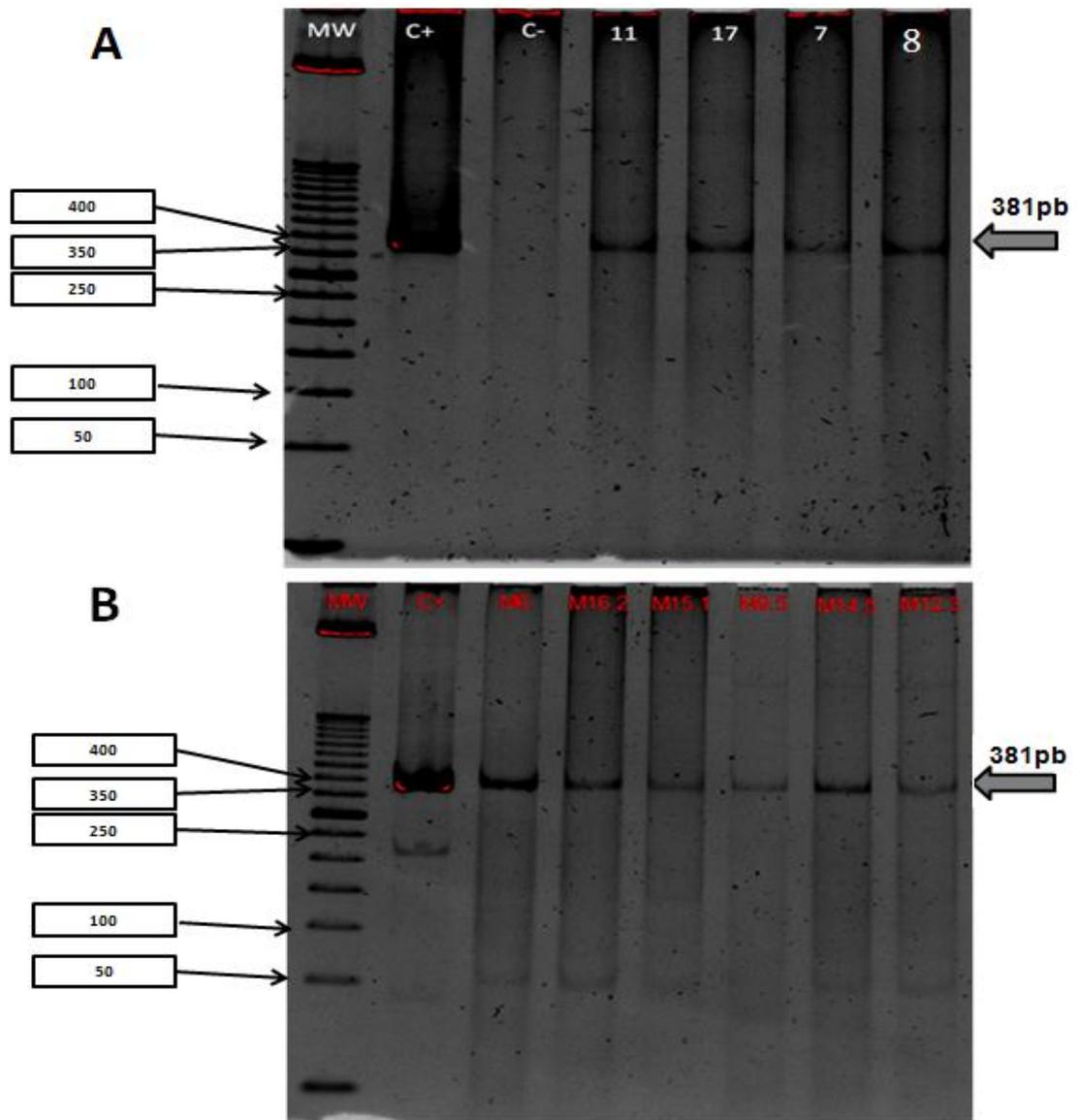


Figura 10. Identificación del gen *gltA* de *Rickettsia sp.* en garrapatas. Se amplificó un fragmento de 381 pb en las muestra de los grupos 11, 17, 7 y 8 (Panel A) y para el grupo 6, 16,15, 9,14 y 12 (Panel B) como lo indica la flecha de la derecha. El control positivo corresponde al gen *gltA* confirmado reportado previamente (Zavala-Castro et al, 2009).

8.2.2 Identificación de especie de *Rickettsia*.

Las 10 muestras positivas a *gltA* se analizaron con la técnica de RFLP, de las cuales 7 muestras presentaron cortes enzimáticos, en las que se incluyen las muestras 7, 8, 9, 11, 12, 15 y 17, en todas ellas se observa la restricción de 1 banda por encima de 100 pb y dos bandas por debajo de este mismo marcador de peso molecular, al cual corresponde a la especie de *Rickettsia typhi* (Figura 11 A), según el patrón que fue descrito por Zavala-Castro et al 2009, para diferentes especies de *Rickettsia* que incluyen *Rickettsia typhi*, *R. akari*, *R. felis*, *R. rickettsii* (Figura 11 B).

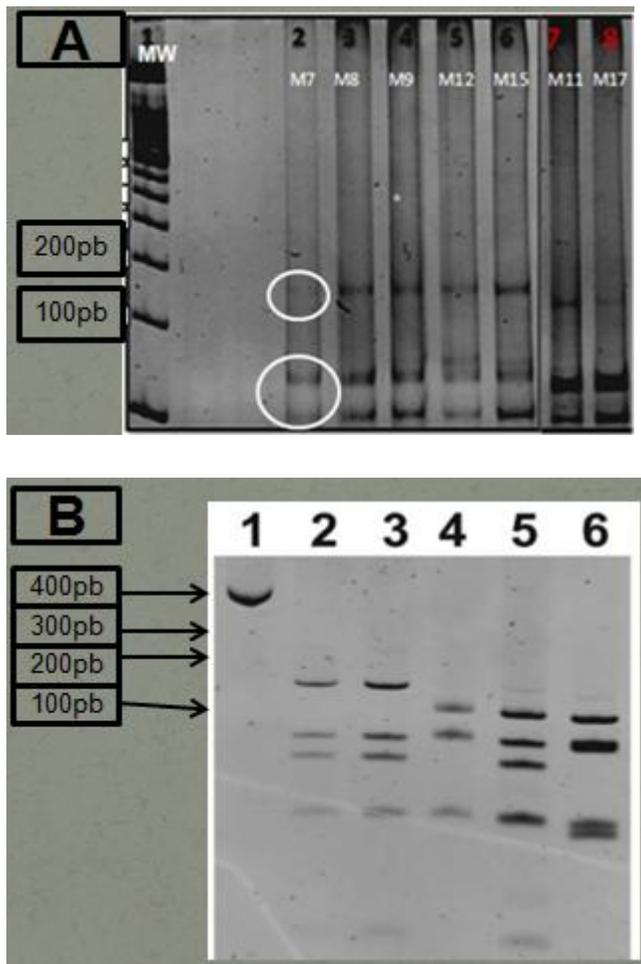


Figura 11. **Identificación de la especie de *Rickettsia* por RFLP utilizando la enzima AluI.** A) Digestión del gen *gltA* de las muestras de garrapatas. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Muestra 7 (**M7**); carril 3: Muestra **M8**; carril 4: **M9**; carril 5: **M12**; carril 6: **M15**; carril **7**: **M11**; carril **8**: **M17**. B) Patrón del Polimorfismo de la Longitud del Fragmento de Restricción del gen *gltA*, y productos de la PCR digeridas con AluI. Carril 1. Gen *gltA* sin digerir; carril 2, caso humano; carril 3, control positivo *Rickettsia typhi*; carril 4, control positivo *R. felis*; carril 5, control positivo *R. akari*; carril 6, control positivo *R. rickettsii*.

Tabla 3. Localidades con grupos de garrapatas en estadios a positivos a *Rickettsia typhi* por RFLP.

Sitio de Muestreo	Fecha de colecta	Etapas de vida de las garrapatas	Grupos (# garrapatas por grupo)	Especie de garrapata	Hospedero	Muestras con amplificación a los genes <i>gltA</i> y <i>htrA</i>	Muestras Positivas por RFLP	Especie de <i>Rickettsia</i>
Tapachula (ciudad)	Octubre 2012	Adultos	3 (10)	<i>Rh. sanguineus</i>	Perro	6,7,9	7,9	<i>R. typhi</i>
Huehuetan (Ejido Guadalupe)	Octubre 2012	Adultos	1 (10)	<i>A. mixtum</i>	Caballo	8	8	<i>R. typhi</i>
Huehuetan (Ejido el Carmen)	Marzo 2013	Adultos	1 (5)	<i>A. mixtum</i>	Humano	11	11	<i>R. typhi</i>
Huehuetan (Cantón Gibraltar)	Marzo 2013	Ninfas	1(8)	<i>A. mixtum</i>	Humano	17	17	<i>R. typhi</i>
Mazatán (San Simón)	Mayo 2013	Ninfas	1(2)	<i>Rh. sanguineus</i>	Perro	12	12	<i>R. typhi</i>
Mazatán (Emiliano Zapata)	Mayo 2013	Ninfas	1 (4)	<i>Rh. sanguineus</i>	Perro	15	15	<i>R. typhi</i>
Huixtla (San Fernando)	Mayo 2013	Ninfas	1(8)	<i>Rh. sanguineus</i>	Perro	16	0	No
Acapetahua (Salvación)	Junio 2013	Ninfas	1 (2)	<i>Rh. sanguineus</i>	Perro	14	0	No
Totales			10 (49)			10	7	

8.3 Tasa mínima de infección por *Rickettsia typhi* por especie de garrapatas.

Lugar	Especie de garrapata	Pooles totales	Total de garrapatas	Pooles positivos	TMI
Tapachula	<i>Rh. sanguineus</i>	8	62	2	3.22
Huehuetán	<i>A. mixtum</i>	5	43	3	6.97
Mazatán	<i>Rh. sanguineus</i>	10	26	2	7.69
Huixtla	<i>Rh. sanguineus</i>	7	33	0	0
Acapetahua	<i>Rh. sanguineus</i>	9	16	0	0
Total		39	180	7	3.88

9. Discusión.

Los resultados sugieren la presencia de 3 especies de garrapatas que incluyen a *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Amblyomma mixtum*. La frecuencia de colecta por tipo de hospedero sugirió que las tres especies de garrapatas registradas en este estudio presentaron una especificidad por un hospedero en particular, en caso de *Rh. sanguineus* demostró preferencia por perros, mientras que *A. mixtum* aunque demostró preferencia por el caballo se observó un comportamiento polífago o generalista ya que también fue colectado sobre vacas, perros, humanos y vegetación (vida libre), y finalmente *Rh. (B) microplus* fue específico para seleccionar al ganado vacuno pero ocasionalmente a perros. Este comportamiento de las especies concuerda con los reportes de Faccioli 2011, que reportó las mismas preferencias de estas especies de garrapatas por los mismos hospederos aquí descritos. Llama la atención de algunos especímenes de *A. mixtum* colectados sobre humanos y vida libre, en primera instancia la infestación en humanos podría ser el resultado de las actividades propias del humano de carácter laboral o de recreación en hábitat focales establecidos para las especies. Este tipo de infestaciones en humanos han sido demostrados en otros estudios y con otras especies como *Amblyomma dissimile* y *A. sabanerae* (Fairchild et al., 1966; Guglielmo et al., 2006). Mientras los ejemplares de vida libre (sobre vegetación) podría tratarse de procesos particularmente que tienen que ver con el ciclo de vida de la garrapata, en donde la garrapata después de depositar sus huevos inmediatamente suben y reposan sobre la vegetación para adherirse sobre un nuevo hospedero, y continuar su ciclo de vida (Goodman et al, 2005). Estos procesos están influenciados por la modificación de ecosistemas que pueden favorecer las interacciones entre mamíferos silvestres con fauna doméstica lo cual incrementa la posibilidad de nuevas relaciones de ectoparásitos y vertebrados, convirtiéndose en un riesgo inminente para salud pública y veterinaria (Bermúdez et al, 2013).

Las tres especies reportadas en el presente estudio, han sido previamente registradas por diversos autores como vectores de patógenos que causan enfermedades importantes en la salud veterinaria y salud pública. Por ejemplo *Rh. sanguineus* es considerado el vector primario de *Ehrlichia canis* (agente causal de la ehrlichiosis), de *Babesia canis vogeli* (agente causal de babesiosis canina) y Rickettsiosis del Grupo de la Fiebre Manchada como *Rickettsia rickettsii* en el nuevo Mundo y *Rickettsia conori* en el viejo Mundo (Otranto et al, 2009; Dantas-Torres 2008, 2010). De la misma manera *A.*

mixtum es el vector principal de *R. rickettsii*, y se sospecha vector de *Brucella* y *Trypanosoma cruzi* en humanos (Smith 1974), y de Piroplasmosis en ganado (Serra Freire y Cunna 1987). Finalmente, *Rh. (Boophilus) microplus* (antes *Boophilus microplus*) es denominada la “Garrapata Común del Ganado”, y es la especie de mayor importancia en el ámbito veterinario por su impacto en la salud bovina, debido a su papel como vector de hemoparásitos como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. (Bock et al, 2008; FAO, 1984; Kocan et al, 2008; López y Vizcaíno, 1992). Ninguno de estos patógenos arriba mencionados fue detectado en las muestras de garrapatas que fueron analizados en este estudio. Sin embargo, sorprendentemente algunos grupos de garrapatas analizadas mediante la técnica de RFLP (Regnery et al, 1991; Zavala-Castro et al, 2009), fueron positivos a infecciones por *Rickettsia typhi*, patógeno del grupo tifus (causante de tifus murino, conocido también como tifus endémico o tifus urbano). Este resultado fue inesperado pero sorprendente, ya que se trata del primer reporte de infecciones naturales por *R. typhi* en poblaciones de garrapatas en el área de estudio, ya que en la naturaleza su principal vector son las pulgas de la rata *Xenopsylla cheopis* (Azad 1997). Un resultado similar fue obtenido en Brasil donde se demostró se encontró la circulación de *Rickettsia felis* en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* adicionalmente a su principal vector *Ctenocephalides felis* (pulga del gato) (Galvão et al 2003 y 2006; Oliveira 2008), contrastando con los estudios de Yucatán, México, donde *R. felis* fue aislado en su vector original *Ctenocephalides felis* pero no en garrapatas (*A. cajennense* o *Rh. sanguineus*), que en un principio fueron propuestos como los vectores usuales de RGFM en México (Zavala-Velázquez 1996, 2000).

Los resultados expuestos anteriormente son producto de este estudio piloto y representan la primera contribución sobre el registro de las especies de garrapatas como *Rhipicephalus sanguineus*, *A. mixtum* y *Rh. (Boophilus) microplus*, incluidos dentro de la familia Ixodidae y que parasitan algunos vertebrados domésticos. También se presenta la evidencia de infecciones naturales por *Rickettsia typhi* en dos de las tres especies particularmente *Rh. sanguineus* y *A. mixtum*, aunque estas infecciones no definen el papel vectorial de las dos especies de garrapatas, sientan las bases para realizar futuros estudios ecoepidemiológicos a gran escala y de competencia vectorial que permitan aclarar su participación dentro de un posible ciclo de transmisión zoonótica en el área de estudio.

10. Bibliografía.

1. Acuna-Soto R, Calderón-Romero L, Romero-López D, Bravo-Lindoro A. Murine typhus in Mexico City. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94: 45.
2. Álvarez-Hernández G. Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son.* 2010; 27(2): 90-91.
3. Azad AF, Radulovic S, Higgins JA, Noden BH, Troyer JM. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3:319–327.
4. Azad AF. Relationship to vector biology and epidemiology of louse and flea-borne rickettsioses. In: Walker DH, editor. *Biology of rickettsial diseases.* Boca Raton (FL): CRC Press; 1988. p. 52-62.
5. Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD/Butantan, 2006. 223p.
6. Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DC, Guglielmone AA, Caceres AG, Guzmán-Cornejo CM, Leon R, Durden LA and Faccini JLH. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology* 2013, 13:267.
7. Bermúdez Sergio E., Cirilo R. Lyons, Gleydis G. García, Yamitzel L. Zaldívar, Amanda Gabster, Griselda B. Arteaga 2013. Serologic evidence of human *Rickettsia* infection found in three locations in Panamá. *Biomédica* 2013; 33(Supl.1):31-7 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.831>.
8. Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M, Cruz C, Felices V, Guevara C, Mendoza L, Villaseca P, Sumner JW, Richards AL, and Olson JG. Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae in Flea and Tick Specimens from Northern Peru. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(11); 4961–4967.
9. Blanc JL, Caminopetros J. Epidemiological and experimental studies on Boutonneuse fever done at the Pasteur Institute in Athens, *Arch. Inst. Pasteur Tunis;* 1932; 20:343–394.
10. Bock RE, Jackson LA, De Vos AJ, Jorgensen WK. (2008). Babesiosis of Cattle. en: bowman, A.; nutall, P. (eds.), ticks: biology, Disease and control. Cambridge University Press. 325 p.

11. Bock, r.E.; Jackson, L.A.; De Vos, A.J.; Jorgensen, W.K. (2008). Babesiosis of Cattle. en: bowman, A.; nutall, P. (eds.), ticks: biology, Disease and control. Cambridge University Press. 325 p.
12. Boero JJ. Las garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea). Buenos Aires: Eudeba. 1957.
13. Boostrom A, Beier MS, Macaluso JA, Macaluso KR, Sprenger D, Hayes J, et al. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:549–54.
14. Burgdorfer W. A review of Rocky Mountain spotted fever (tick borne typhus), its agent, and its tick vectors in the United States. *J Med Entomol* 1975; 12: 269-278.
15. Burgdorfer W. Ecological and epidemiological consideration of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker DH, editor. *Biology of Rickettsial Diseases*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1988. p. 33-50.
16. Bustamante ME y Varella G. Distribución de las rickettsiasis en México. *Rev Inst Salubr Enfer Trop.* 1947; 8; 3-14.
17. Bustamante ME y Varella G. Estudio de la fiebre manchada en Mexico. Fiebre Manchada en la Laguna. *Rev Inst Salubr Enfer Trop.* 1946;7;39-49.
18. Bustamante ME y Varella G. Una nueva rickettsiosis en México. Existencia de la Fiebre Manchada americana en los estados de Sinaloa y Sonora. *Rev Inst Salubr Enf Trop* 1943; 4:189–211.
19. Calderón Romero L. Rickettsiosis. Tay JT, Ed. *Microbiología y Parasitología Medicas*. 3ª edición. México: Mendez Editores 2008: 178-182.
20. Castro MB, Wright SA. Vertebrate hosts of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in California. *J Vector Ecol.* 2007; 32(1): 140-9.
21. CDC. Tick borne diseases of the United States. A Reference Manual for Health Care Providers. First Edition, 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/lyme/resources/TickborneDiseases.pdf>.
22. Cohen SB, Yabsley MJ, Garrison LE, Freye JD, Dunlap BG, Dunn JR, Mead DG, Jones TF y Moncayo AC. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma americanum* Ticks, Tennessee and Georgia, USA. *Emerg Infect Dis* 2009; 15; 9.
23. Cowan G.O. "Rickettsial infections". En: *Manson's Tropical Diseases*. Gordon Cook & Alimuddin Zumla (eds.) Editorial WS Saunders, 21 edición 2004: 4; 891-906.
24. Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC, Krebs JW, Fishbein DB, Olson JG, Childs JE. National surveillance for Rocky Mountain spotted fever, 1981-1992: epidemiologic

- summary and evaluation of risk factors for fatal outcome. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 52(5): 405-13.
25. Daniel M. and Dusbábek F. Micrometeorological and microhabitat factors affecting maintenance and dissemination of tick-borne diseases in the environment. In: Sonenshine, DE and Mather TN. Eds, *Ecological Dynamics of Tick Borne Zoonoses*. New York, Oxford: Oxford Univ. Press, 1994, pp. 91-138.
 26. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors* 2010, 3:26.
 27. Dantas-Torres F: The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 2008, 152:173-185.
 28. Elfving K, Olsen B, Bergström S, Waldenström J, Lundkvist A, Sjöstedt A, Mejlom H Y Nilsson K. Dissemination of Spotted Fever Rickettsia Agents in Europe by Migrating Birds. *PLoS ONE* 2010. 5(1): e8572. doi:10.1371/journal.pone.0008572.
 29. Faccioli V. Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de la colección de invertebrados del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino. Serie de Catálogos No 25. Santa Fe Argentina. 2011.
 30. Fairchild, G.B, Kohls, G.M. and Tipton, V.J. 1966. The ticks of Panama (Acarina: Ixodidae). In: *The ectoparasites of Panama*, pp. 167–219.
 31. Falco RC, Fish D. Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO₂ baited traps. *J Med Entomol.*1991; 28(5):726-9.
 32. Field Cortazares J y Seijo y Moreno JL. Rickettsiosis en Baja California. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son* 2011; 28(2); 44-50.
 33. Fritzen CM, Huang J, Westby K, Freye JD, Dunlap B, Yabsley MJ, Schardein M, Dunn JR, Jones TF, Moncayo AC. Infection prevalences of common tick-borne pathogens in adult lone star ticks (*Amblyomma americanum*) and American dog ticks (*Dermacentor variabilis*) in Kentucky . *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85(4):718-23.
 34. Galvão MA, Mafra CL, Moron C, Anaya E, Walker DH. Rickettsiosis of the genus *Rickettsia* in South America. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 990: 57-61.
 35. Galvao MA, Zavala-Velazquez JE, Zavala-Castro JE, Mafra CL, Calic SB, Walker DH. *Rickettsia felis* in the Americas. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1078:156–8.
 36. Garcia E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional autónoma de México (UNAM). México.

37. Gatto Brito L, Goulart da Silva Netto F, Sena Oliveira MC, Da Silva Barbieri F. 2006. Bio-ecologia, importância medicoveterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Porto Velho: Embrapa Rondonia, 21 p. – (Documentos / Embrapa Rondonia, ISSN 0677-8618; 104).
38. Goddard H. Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance. Editorial CRC Press 4th Edition. 2003.Pag. 444.
39. Goddard J and Layton B. 2006. A guide to Ticks of Mississippi. Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station. Mississippi State University. Bulletin 1150. Pp. 17.
40. Goodman J, Dennis DT, and Sonenshine DE. Tick-Borne Diseases of Humans. Editorial Asm-Press. Whashington D. C. 2005. pp. 401.
41. Gordillo G, Torres J, Solorzano F, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R and Muñoz O. Serologic Evidences Suggesting the Presence of *Borrelia burgdorferi* Infection in Mexico. Archives of Medical Research 1999; 30 (1); 64–68.
42. Gordillo-Pérez G, Torres J, Solórzano-Santos F, de Martino S, Lipsker D, Velázquez E, et al. *Borrelia burgdorferi* infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. Emerg Infect Dis 2007; 13(10);1556-8.
43. Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MP, Martins JR, González-Acuña D, Estrada-Peña A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Exp Appl Acarol. 2006; 40(2):83-100.
44. Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Keirans, JE, Robbins RG. Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical Zoogeographic Region. The netherlands: International consortium on ticks and tick borne Diseases (IcttD – 2). 2003;173.
45. Hasle G. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. Frontiers in cellular Biology and infection Microbiology. 2013; 3(48);1-6.
46. Hoogstraal H: Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Adv Parasitol 1985, 24:135-238.
47. <http://www.afpmb.org>.
48. <http://www.bio.davidson.edu/people/sosarfova/assets/bio307/liwoeste/PathogenLifeCycle.html>.
49. http://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html.
50. <http://www.cdc.gov/vhf/crimean-congo/>.

51. Institute of Medicine. Sustaining Global Surveillance and Response to Emerging Zoonotic Diseases, Washington, DC (2009): National Research Council.
52. Jongean F y Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004; 129 Suppl:S3-14.
53. Kayali U, Mindekem R, Yemadji N, Oussiguere A, Naissengar S, Ndoutamia AG, Zinsstag J. Incidence of canine rabies in N'Djamena, Chad. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; 61:227–233.
54. Keirans JE and Litwark TR. Pictorial Key to the Adults of Hard Ticks, Family Ixodidae (Ixodida: Ixodoidea), East of the Mississippi River. *J. Med. Entomol.* 1989; 26(5): 435-448.
55. Kocan, KM, de la Fuente J, Blouin E, Coetzee J, Ewing S. The Natural History of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 2010; 167(2-4), 95-107.
56. Labruna MB, Mattar VS, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, Sousa R, Oteo J, Jorge Zavala-Castro JE. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. MVZ Córdoba*. 2011; 16(2):2435-2457.
57. Lima WS, Ribeiero MF y Guimaraes MP. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2000; 32(6); 375-380.
58. López G y Vizcaíno O. Transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* por la garrapata *Boophilus microplus*. *Revista ICA*, 1992; 27; 437-443.
59. Mariotte CO, Bustamante ME. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* infectado naturalmente con Fiebre Manchada en Sonora (México). *Rev Inst Salub Enf Trop* 1944; 297–300.
60. Medina-Sanchez A, Bouyer DH, Alcantara-Rodriguez V, Mafra C, Zavala-Castro J, Whitworth T, Popov VL, Fernandez-Salas I, Walker DH. Detection of a typhus group Rickettsia in *Amblyomma ticks* in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1063: 327-32.
61. Merhej V, Roault D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos.* 2011; 86; 379-405.
62. Moncayo AC, Cohen SB, Fritzen CM, Huang E, Yabsley MJ, Freye JD, Dunlap BG, Huang JJ, Mead DM, Jones TF and Dunn JR. Absence of *Rickettsia rickettsii* and Occurrence of Other Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks from Tennessee. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(3); 653–657.

63. Morales-Betoulle MA, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R and Cordón-Rosales C. *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* Ticks, Chicago Area. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12; 6; 1039-1041.
64. Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CCA, Silva Jr A, Almeida MR, Almada G, Bouyer DH, Galvão MAM, Mafra CL. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2008;103(2): 191-194.
65. Oliver Jr. JH. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1989; 20:397-430.
66. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt, EB. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol*. 2009; 25, 157–163.
67. Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, McLellan SL, Tamminga CL, Ohl CA. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(6):805-11.
68. Parker RR, Hohls GM, Cox GW, David GE. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. *Public Health Rep*. 1939; 54:1482-4.
69. Parola P and Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat, *Clin. Infect. Dis*. 2001; 32:897–928.
70. Parola P, Paddock CD y Raoult D. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(4):719–756 (A).
71. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Yazid Abdad M, Stenos J, Bitam I, Fournier PE and Raoult D. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013; 26: 657-702.
72. Ralph D, Pretzman C, Daugherty N, Poetter K. Genetic relationships among the members of the family Rickettsiaceae as shown by DNA restriction fragment polymorphism analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 590: 541–52.
73. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 694-719.
74. Raoult D. A New Rickettsial Disease in the United States. Editorial commentary 2004:38 (Marzo 15th).

75. Regnery RL, Spruill CL, Plikatys BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 1991;173:1576–89.
76. Rehacek, J. *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology. *Acta Sci. Nat. Brno.* 1984; 18:1–50.
77. Ricketts HT. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations, *Med. Rec.* 1909; 16:843–855.
78. Ricketts HT. The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood tick (*Dermacentor occidentalis*). *JAMA* 1906; 47:458
79. Santibáñez S, Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Oteo JA. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(5):283–288.
80. Schelling E, Diguimbaye C, Daoud S, Nicolet J, Boerlin P, Tanner M, Zinsstag J. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; 61:279–293.
81. Schriefer ME y Azad AF. 1994. Changing ecology of Rocky Mountain spotted fever, p. 314–326. In D. E. Sonenshine and T. N. Mather (ed.), *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses.* Oxford University Press, New York, N.Y.
82. Sistema Nacional de Investigación Epidemiológica. Una Enfermedad Presente pero Olvidada, Número 46 Volumen 27 Semana 46 Del 14 al 20 de Noviembre de 2010.
83. Smith MW. Some aspects of the ecology and life cycle of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) in Trinidad and their influence on tick control measures. *Ann Trop Med Parasitol* 1974; 69: 121-129.
84. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. *Vet. Res.* 2009; 40:34.
85. Sonenshine, DE. 1991. *Biology of ticks.* Volume 1. Oxford University Press, New York.
86. Steiner FE, Pinger RR and Vann CN. Infection Rates of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) and Prevalence of *E. chaffeensis*-Reactive Antibodies in White-Tailed Deer in Southern Indiana, 1997. *J Med Entomol.* 1999; 36(6); 715-719.

87. Sumner JW, Durden LA, Goddard J, Stromdahl EY, Clark KL, Reeves WK, et al. Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:751–3.
88. Telford SR y Goethert HK. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'? *Parasitology* (2004), 129;301-327.
89. Todar K. Rickettsial Diseases, including Typhus and Rocky Mountain Spotted Fever. 2008-2012. Consultado: 07-01-2013. Disponible en: http://textbookofbacteriology.net/Rickettsia_2.html.
90. Williams SG, Sacci JB Jr, Schriefer ME, Anderson EM, Fujioka KK, Sorvillo FJ, Barr AR, Azad AF. Typhus and typhus-like rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California. *J Clin Microbiol* 1992;30(7); 1758-62.
91. World Bank. People, Pathogens and Our Planet, Vol 1: Towards a Once Health Approach for Controlling. Zoonotic Diseases. 2010. Report 50833-GLB.
92. Zavala Velázquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sánchez-Elías RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. *Lancet* 2000; 356:1079-80.
93. Zavala Velázquez JE, Yu X-H, Walker DH. Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in México. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 157-159.
- ~~94. Zavala Velázquez JE, Yu X-H, Walker DH. Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in México. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 157-159.~~
95. Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, León JJ, Walker DH, Zavala-Velázquez JE. An increase in human cases of spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico, involving children. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(6):907-10.
96. Zavala-Castro JE, Zavala-Velazquez JE, Peniche-Lara GF, Sulú Uicab JE. Human Rickettsialpox, Southeastern Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(10);1665-67. (B)
97. Zavala-Castro JE, Zavala-Velazquez JE, Sulú Uicab JE. Murine Typhus in Child, Yucatan, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(6); 972-974. (A)
98. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, Ruiz-Sosa JA, Small MA, and Dzul-Rosado KR. Fatal Human Infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. *Emerg Infect Dis;* 2006; 12(4).

99. Zar, J. H. 1999. Bioestatistical analysis. 4th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.