

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PATÓGENOS RICKETTSIALES ASOCIADOS A IXÓDIDOS EN
ÁREAS RURALES DE COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO

Tesis

Que presenta ANTONIO CASTILLO MARTINEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

Torreón, Coahuila

Diciembre 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PATÓGENOS RICKETTSIALES ASOCIADOS A IXÓDIDOS EN ÁREAS
RURALES DE COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO


Tesis

Que presenta ANTONIO CASTILLO MARTINEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS



Dr. Aldo Iván Ortega Morales
Director UAAAN



Dr. Luis Tinoco Gracia
Director Externo IICV-UABC

Torreón, Coahuila

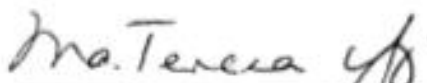
Diciembre 2017

PATÓGENOS RICKETTSIALES ASOCIADOS A IXÓDIDOS EN ÁREAS
RURALES DE COAHUILA Y DURANGO, MÉXICO

Tesis


Elaborada por ANTONIO CASTILLO MARTINEZ como requisito parcial para
obtener el grado de Doctor en Ciencias Agrarias con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría


Dr. Aldo Juan Ortega Morales
Asesor Principal

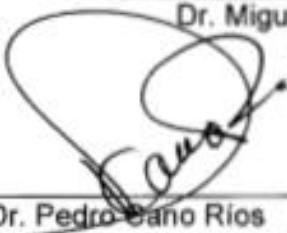

Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga
Asesor



Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos
Asesor


Dr. Alfredo Ogaz
Asesor


Dr. Luis Tinoco Gracia
Asesor


Dr. Miguel Angel Gallegos Robles
Asesor


Dr. Pedro Cano Rios
Jefe del Departamento de Postgrado


Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Postgrado

Torreón, Coahuila

Diciembre, 2017

Agradecimientos

Se agradece ampliamente el esfuerzo brindado por todas las personas involucradas de manera directa e indirectamente en la presente Tesis; donde cada uno de ellos depositó su paciencia, tiempo, opiniones y correcciones para que este proyecto pudiera realizarse.

Agradezco a mi Dios todopoderoso; porque con mi fe depositada en él, me ha permitido existir, crecer, madurar y levantarme de los tropiezos de la vida, guiándome siempre por el buen camino.

A mi Alma Mater por darme la oportunidad de tener una profesión, por brindarme una educación y formación con pensamiento crítico, científico y humanitario con los retos que se presenten en el ámbito laboral y social. Así mismo agradezco el apoyo económico brindado para financiar parte de los costos de este proyecto de investigación.

Agradezco de manera sincera e infinitamente el valioso apoyo brindado por mis Asesores Dr. Aldo Iván Ortega Morales, Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga, Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos y al Dr. Miguel Ángel Gallegos Robles; por aceptar, apoyar, aportar, opinar, cuestionar, revisar y corregir este proyecto. De antemano muchas gracias por su paciencia, tiempo y dedicación para hacer realidad este trabajo; ya que fue de mucha dedicación para todo el equipo.

Al Departamento de Parasitología en especial al M. C. Javier López Hernández, a la Sra. Graciela Armijo, a la Ing. Bertha Alicia Cisneros, al M. C. Fabián García Espinoza y demás miembros adscritos al departamento; por brindarme su amistad, orientarme, auxiliarme y apoyarme durante la realización de este proyecto. Agradezco enormemente a la Ing. Gabriela Muñoz por todas sus atenciones y facilidades brindadas con los instrumentos y accesorios requeridos durante el proceso de experimentación de esta tesis.

Un especial Agradecimiento al Laboratorio de Biología Molecular del

Departamento de Parasitología de la UAAN-Unidad Laguna por abrir e inaugurar sus puertas en la realización de este proyecto de Tesis; puesto que éste fue uno de los primeros trabajos efectuados en este laboratorio. Así mismo aprovecho este espacio para agradecer al Dr. Aldo Iván Ortega Morales por otorgar el permiso y las facilidades para trabajar en el Laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante dos años hasta la culminación de este proyecto; ya que sin ello no podría lograrse este sueño.

Al Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la UJED, por facilitar su espacio para realizar las primeras 10 muestras de estandarización.

Así mismo se reconoce y agradece el apoyo de QFB. Norma Lydia Rangel Carrillo del Departamento de Suelos UAAAN-UL y a QFB Ana María Mejía Fernández del Laboratorio de Biología UAAAN-UL por brindar las facilidades, aunque mínimas pero necesarias para complementar esta investigación.

Igualmente se agradece el apoyo a la Dra. Verónica Ávila y la Dra. Quetzaly Siller por sus aportaciones, consejos y enseñanzas relacionadas al manejo del equipo de laboratorio molecular.

A mis adorados padres por todo su apoyo moral e incondicional, porque me alientan a seguir estudiando ya que en esta vida siempre hay algo nuevo que aprender. A mis hermanos, amigos y amigas, que entienden mi ausencia, me comprenden y tienen en cuenta que mis logros también son parte de ellos; por su inmenso apoyo muchas ¡Gracias!

Dedicatorias

A mi Madre **Ma. Isabel Martínez Lucas** por soportar mi ausencia durante todo el proceso de mi formación desde la Primaria hasta la actualidad, por abogar siempre que la educación ayuda a abrir nuevas puertas que nos servirán para derribar cualquier obstáculo que se nos ponga enfrente. Por todo su apoyo, por creer en mí, por motivarme a sobresalir en la vida y por ser parte de mis logros.

A mi Padre **Lauro Castillo Solís** por dejarme intentar un reto que le parecía imposible y convencerse de que cuando en la vida se quiere sobresalir, si se puede. Por todo su apoyo incondicional y por compartir conmigo sus alegrías y tristezas.

A mis hermanos **Donaciano, Eugenia, Filiberto y Marcelino**, que han compartido conmigo sus saberes, momentos de angustia y felicidad. Por seguir creyendo en mí, por acompañarme, guiarme y apoyarme en todos mis logros y fracasos, los estimo demasiado.

A mi hija **Isabel Tonantzin** quien es el motor de mi inspiración, mi motivación para seguir adelante, y por comprender que tanto mis ocupaciones como mis metas son parte de ella.

Cartas de aceptación de los artículos



ACTA ZOOLOGICA MEXICANA
nueva serie

MANUSCRITO AZMI4-59

Xalapa de Enríquez, Veracruz, a 23 de Octubre de 2014
Ref./AZM/376/2014

Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Torreón, Coahuila, México

Por este medio hago de su conocimiento que su trabajo científico titulado: “**Detección de *Rickettsia* sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México**” elaborado por usted como autor de correspondencia junto con A. Castillo-Martínez, S. M. Cueto-Medina, S. Hernández-Rodríguez, M. A. Gallegos-Robles, M. T. Valdes-Perezgasga y A. I. Ortega-Morales, ha sido aceptado para su publicación en el **Volumen 31, No. 1** de *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* que aparecerá en Abril de 2015.

Considerando que nuestra revista no cobra derecho de página y que los trabajos publicados a partir de 1984 están disponibles en la página web del Instituto de Ecología A. C. (www.inecol.edu.mx/azm), le enviaremos los sobretiros electrónicos.

Agradezco su comprensión y aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Pedro Reyes Castillo
Editor

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.
Antigua Carretera a Coatepec No. 351. El Haya. 91070 Xalapa, Veracruz. México
Tel. (228) 842-18-00 Fax. (228) 818-78-09 e-mail: acta.zoologica@inecol.edu.mx



ACTA ZOOLOGICA MEXICANA
nueva serie

MANUSCRITO AZM16-91

Xalapa de Enríquez, Veracruz, a 04 de Mayo de 2017
Ref./AZM/100/2017

M.C. Sergio Hernández Rodríguez
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Torreón, Coahuila, México

Por este medio hago de su conocimiento que su trabajo científico titulado: **“Detección de *Rickettsia rickettsii* Brump (Rickettsiales: Rickettsiaceae) en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Ixodida: Ixodidae) en la Comarca Lagunera, zona reemergente de Fiebre Manchada en México”** elaborado por usted como autor de correspondencia junto con Antonio Castillo-Martínez, Sarai M. Cueto-Medina, María Teresa Valdés-Perezgasga, Francisco J. Sánchez-Ramos, Javier López-Hernández y Aldo I. Ortega-Morales, ha sido aceptado para su publicación en el **Volumen 33, No. 2** de *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* que aparecerá en Agosto de 2017.

Considerando que nuestra revista no cobra derecho de página y que los trabajos publicados a partir de 1984 están disponibles en la página web del Instituto de Ecología A. C. (www.inecol.edu.mx/azm), le enviaremos los sobretiros electrónicos.

Agradezco su comprensión y aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Pedro Reyes Castillo
Editor

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.
Antigua Carretera a Coatepec No. 351. El Haya. 91070 Xalapa, Veracruz. México
Tel. (228) 842-18-00 Fax. (228) 818-78-09 e-mail: acta.zoologica@inecol.edu.mx

INTRODUCCIÓN

La Fiebre manchada se considera una enfermedad reemergente en México, Centro y Sudamérica, es ocasionada por *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi* (Hidalgo *et al.*, 2007). Los principales vectores del patógeno que ocasiona la Fiebre Manchada en México son *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* y *Dermacentor variabilis* (NOM-EM-001-SSA, 1999). *R. sanguineus* es vector de bacterias, protozoarios (Xianxun & Wenshun, 1997), piroplasmas (Samish *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1995), virus, toxinas (Goddard, 2007) y rickettsias (Bruning, 1996). Desde los años 1930 a 1950, se presentaron casos clínicos confirmados de *R. rickettsii* transmitidos por la garrapata *R. sanguineus* en los estados de Baja California, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora (Bustamante y Varela, 1943; Labruna *et al.*, 2011).

Rickettsia rickettsii, es un cocobacilo intracelular obligado gram-negativo de la familia Rickettsiaceae (Zavala-Velázquez *et al.*, 1999), tiene forma bacilar lanceolada, mide de 0.2 a 0.3 micras de ancho por una micra de largo. Se replica en el citoplasma de las células infectadas (Marchant & Racker, 1980), en las células epiteliales del intestino de la garrapata, en las glándulas salivales, en los ovarios (Madigan *et al.*, 2006), está presente en las heces de las garrapatas y se transmite transováricamente en las garrapatas *R. sanguineus* (Marchant & Racker, 1980); la bacteria también se replica y potencializa en los artrópodos que actúan como reservorios y ocasionalmente en el hombre (Jawetz *et al.*, 1996; Quinn & Markey, 2003).

La Comarca Lagunera cuenta con las condiciones ambientales, geográficas, demográficas, epidemiológicas y socioeconómicas (marginación y pobreza); donde los habitantes conviven con gran cantidad de perros en viviendas construidas de adobe con piso de tierra; estos factores propician el desarrollo y permanencia del vector (*R. sanguineus*) en el área semidesértica (NOM-EM-001-SSA2, 1999). Los primeros casos positivos a Fiebre Manchada en humanos se registraron en los ejidos Jimulco (Ortiz-Mariotte, 1945); Granada y Zaragoza, ocasionados por mordedura de garrapatas *R. sanguineus* (Bustamante *et al.*, 1946). En esta región geopolítica, mediante estudios serológicos se aislaron dos cepas de rickettsia en garrapatas *R. Sanguineus* (Bustamante *et al.*, 1946), sueros humanos y perros (Silva-Goytia & Elizondo, 1953). Covarrubias *et al.*, (2007) encontraron 10 muestras positivas a *Rickettsia rickettsii* mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), en los municipios de San Pedro de las Colonias y Francisco I. Madero; mientras que Castillo-Martínez *et al.*, (2014) registraron el hallazgo de 4 muestras positivas para *Rickettsia* sp. en el ejido Atalaya, obtenidas mediante PCR.

En México existe una deficiencia en el estudio y control de la Fiebre Manchada, ya que los factores ecológicos y epidemiológicos responsables de la transmisión de *R. rickettsii* por garrapatas a humanos no se han determinado con exactitud; no existe una lista actualizada sobre la distribución de garrapatas vectores ni de los patógenos rickettsiales presentes en el país. Las investigaciones sobre Fiebre Manchada son muy escasas, solo predominan estudios clínicos en los estados de Baja California, Yucatán y Coahuila; por ello, la taxonomía e identificación

molecular de especies rickettsiales en garrapatas en México es un tema escasamente investigado y de reciente interés en el diagnóstico molecular.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Generalidades de las garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos obligados, de hábitos evolutivos hematófagos (Bowman, 2011), que parasitan una gran diversidad de especies animales (Samish & Rehacek, 1999) como mamíferos, ganado vacuno, aves, reptiles, anfibios y ocasionalmente humanos (Farias, 1999; Venzal *et al.*, 2003; Robinson, 2005) al ser atraídas por el olor y calor que éstos emanan. Se alimentan de sangre, líquidos tisulares y desechos celulares (Harwod & James, 1987) para sobrevivir y reproducirse (Samish & Rehacek, 1999). Algunas especies necesitan de uno a tres hospederos para completar su ciclo de vida (Garris, 1991); son reservorios potenciales de agentes patógenos como erlichias, anaplasmas, borrelias y rickettsias (Guarente, 1997).

Por sus hábitos hematófagos, a las garrapatas se les considera el segundo grupo más importante en causar enfermedades a humanos, después de los mosquitos. Tienen gran importancia médica y veterinaria, ya que producen daños a sus hospederos por acción directa o indirecta a través de la inoculación de organismos patógenos (Venzal *et al.*, 2003).

Transmiten numerosos protozoarios, virus, bacterias (incluidas las rickettsias) y hongos patógenos. El primer reporte documentado sobre la transmisión de una enfermedad causada por garrapatas, fue realizado por Smith y Kilbourne en 1893; quienes la llamaron como fiebre del ganado de Texas, ocasionado por el protozoario *Babesia bigemina* y transmitido por la garrapata del ganado *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Canestrini. El informe de esta época pronto dio lugar a una nueva era del estudio de los insectos, ácaros y garrapatas en la transmisión de enfermedades. Posterior a ese descubrimiento, surgieron otras enfermedades transmitidas por garrapatas (Sonenshine *et al.*, 2002; Bowman, 2011).

En 1904, se demostró que la Fiebre de la Costa Oriental del ganado Africano era causada por el protozooario *Theileria parva* transmitido por garrapatas. Tiempo después (1905) se descubrió que la Fiebre recurrente ocasionada por la espiroqueta *Borrelia duttoni* era transmitida por garrapatas. Desde el año 1906, se demostró que la Fiebre Manchada de Las Montañas Rocosas es causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii* y la transmitían garrapatas. En 1932 ciertos tipos de encefalitis, como la Encefalitis Rusa de Primavera-Verano fueron causadas por virus transmitidos por garrapatas. El más reciente hallazgo relacionado a las garrapatas como vectores de patógenos son la enfermedad de Lyme y la Ehrlichiosis humana. Desde su reconocimiento en Connecticut en el año de 1977, la enfermedad de Lyme es una de las enfermedades transmitidas por vectores a humanos más importante en Estados Unidos, Europa y Asia (Sonenshine *et al.*, 2002).

1.2. Clasificación taxonómica de las garrapatas

En el siglo IV Aristóteles documentó a las garrapatas como parásitos repugnantes; posteriormente Linneo las clasificó de manera ordenada en 1746, ubicándolos como Acari dentro del género *Acarus*. El 1884, Koch separó a las garrapatas de los Acari, en el cual estaban los ácaros y las garrapatas; en 1896 Neuman colocó a las garrapatas en el orden Acarina y las dividió en dos subfamilias: Argasinae e Ixodinae; las cuales fueron elevadas por Salmon y Stiles en 1901 al rango de familia dentro de la superfamilia Ixodoidea, establecida por Banks en 1894 (Harwood & James, 1987).

Niveles taxonómicos de las garrapatas (Hoskins, 1991).

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Chelicerata

Clase: Arachnida

Orden: Acarina

Grupo: Parasitiformes

Suborden: Ixodoidea

Familias: Ixodidae,
Argasidae, Nuttalliellidae

Existen alrededor de 825 especies de garrapatas clasificadas dentro del suborden Ixodida, la cual se divide en tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae o garrapatas blandas (Soulsby, 1988) y Nuttalliellidae (Klompen *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2009; Bowman, 2011); las cuales se ubican como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1 **Clasificación del suborden Ixodida según Horak et al. (2002).**

Familia	Subfamilia (Subgrupo)	Género (Subgénero)
Ixodidae	Ixodinae (Prostriata)	<i>Ixodes</i>
	Amblyomminae (Metastriata)	<i>Amblyomma</i>
	Bothriocrotoninae (Metastriata)	<i>Bothriocroton</i>
	Haemaphysalinae (Metastriata)	<i>Haemaphysalis</i>
	Hyalomminae (Metastriata)	<i>Hyalomma</i>
		<i>Anomalohimalaya</i>
		<i>Cosmioma</i>
		<i>Dermacentor</i>
	Rhipicephalinae (Metastriata)	<i>Margaropus</i>
		<i>Nosoma</i>
	<i>Rhipicentor</i>	
	<i>Rhipicephalus (Boophilus)</i>	
Argasidae	Argasinae	<i>Argas</i>
	Ornithodorinae	<i>Ornithodoros, Carios</i>
	Otobinae	<i>Otobius</i>
Nuttalliellidae		<i>Nuttalliella</i>

1.3 Familia Ixodidae

Las garrapatas duras (Ixodidae) se agrupan en otros dos taxones; las del género *Ixodes* poseen una ranura anal extendida hacia la parte anterior cerrando en el ano y se clasifican como Prostriata (Subfamilia Ixodinae). Las garrapatas de los otros géneros tienen la abertura anal situada en la parte posterior anal y se agrupan como Metastriata (Horak *et al.*, 2002).

La familia Ixodidae agrupa seis subfamilias, 12 géneros y 683 especies; los géneros que la constituyen son: *Ixodes*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Anomalohimalaya*, *Cosmioma*, *Dermacentor*, *Margaropus*, *Nosoma*, *Aponomma*, *Rhipicentor* y *Rhipicephalus* (Soulsby, 1988; Keirans, 1992; Barriga, 2002); recientemente se agregó el género *Bothriocroton* (Horak *et al.*, 2002) y se ubicó a *Boophilus* dentro del género *Rhipicephalus* considerado anteriormente

como género de *Ixodidae* (Murrel & Barker, 2003; Barker & Murrell, 2002).

En Norteamérica se encuentran establecidos cinco géneros de garrapatas, los cuales son *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*; así como otros ocasionales que llegan en animales importados (Bowman, 2011). Del género *Rhipicephalus*, la única especie en América Latina es *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Barriga, 2002), la cual es conocida vulgarmente como garrapata café del perro (Alcaíno *et al.*, 1990).

Las garrapatas duras (*Ixodidae*) presentan un par de ojos simples, situados a los márgenes o submárgenes laterales del escudo y en los submárgenes de ciertas garrapatas blandas. Las especies que no presentan ojos se sustituyen por órganos fotosensibles, que les permiten reaccionar positivamente a intensidades bajas de luz y negativamente a altas intensidades luminosas (Panfilova, 1976).

1.3.1 Ecología y hábitos de la familia Ixodidae

Las garrapatas de la familia *Ixodidae* se encuentran en lugares hasta los 2600 msnm, con precipitaciones de 400 a 2800 milímetros anuales (Lima *et al.*, 2000). La distribución geográfica y el hábitat de muchas especies está controlada por la temperatura ambiental (Hernández *et al.*, 2000). Pueden sobrevivir en condiciones adversas, pero prefieren humedad alta y temperaturas mayores a 20°C; ya que la falta de humedad atmosférica puede romper su ciclo de vida (Teel *et al.*, 1991).

Las larvas de *Rhipicephalus* spp., pueden sobrevivir hasta 43 días con 84% de humedad relativa y 20°C; pero sufren daños si la humedad disminuye del 63% (Hugh-Jones, 1992). Todas las garrapatas de la familia *Ixodidae* son susceptibles a la falta de humedad (McKenzie, 2001). La baja humedad relativa tiene efecto directo sobre el porcentaje de garrapatas durante las épocas del año que tienen mayor actividad (Brizuela *et al.*, 1996).

Las garrapatas, cuando están saturados de agua dejan el nivel del suelo y al deshidratarse bajan nuevamente a la superficie; cuando las condiciones

ambientales no les favorecen, recuperan el agua acumulada en forma de rocío (Wilkinson, 1953) o absorbiendo vapor de agua de la humedad ambiental; esto último se logra secretando un sólido hidroscópico cristalino por las partes bucales (Rudolph & Knulle, 1974). Los argásidos excretan el exceso de agua y logran el balance de electrolitos por las glándulas coxales; los ixódidos usan las glándulas salivales para lograr estas funciones (Kaufman & Phillips, 1973). La familia Argasidae soporta equilibrios de humedad más bajos que los ixódidos, lo que les permite vivir exitosamente en ambientes más secos (Semtner *et al.*, 1971). Las temperaturas entre 15 °C y 37 °C disminuyen el umbral de postura de huevos (Fourie & Horak, 1992); para asegurar una eclosión alta (Peavey & Lane, 1996) las garrapatas ponen sus huevos bajo la vegetación donde hay sitios húmedos, frescos y libres de radiación solar (Barnard, 1989). Cuando las larvas emergen se refugian en la sombra de pastizales, maleza o debajo del suelo para protegerse del sol y evitar desecarse; para buscar alimento trepan a la vegetación, muros u otras estructuras en las horas frescas del día (Geevarghese & Dhanda, 1995). Aunque existen especies de garrapatas que parasitan animales de su preferencia, cualquier hospedante puede llegar a constituirse en su presa (Spickett, 1994).

La mayoría de los vertebrados son susceptibles al ataque de garrapatas por el calor corporal, la exhalación de CO₂ y el ácido butírico que éstos desprenden (Rechav *et al.*, 1994). Las larvas se pueden mover hasta 8 metros de su sitio original y trepan a la maleza o los pastizales para esperar a sus hospederos (Falco *et al.*, 1996).

Por sus hábitos alimenticios, las garrapatas son vectores de enfermedades en animales domésticos y seres humanos del entorno agrícola y urbano (Robinson, 2005; Bowman, 2011).

1.4 Género *Rhipicephalus*

Son fácilmente reconocidos por la base del capítulo de forma hexagonal, tienen ojos, festones, escudos sin ornamentación, los machos tienen placas adanales y escudos accesorios prominentes (Bowman, 2011). Las garrapatas de este género parasitan mamíferos y cuando son larvas o ninfas raramente atacan aves o reptiles. El género *Rhipicephalus* se encuentra ampliamente distribuido en Centro y Sudamérica (Barriga, 2002). En México las especies del género *Rhipicephalus* de mayor importancia son *Rhipicephalus microplus* Canestrini, *R. annulatus* Say y *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (SAGAR, 1996); ésta última se conoce vulgarmente como garrapata café del perro (Alcaíno *et al.*, 1990).

1.4.1 *Rhipicephalus sanguineus* Latreille

Las larvas de *R. sanguineus* tienen seis patas, las ninfas y adultos tienen ocho patas (Barriga, 2002; Lord, 2007). Los machos miden aproximadamente 3 milímetros de longitud, tienen forma aplanada, son de color café rojizo a oscuro, sin marcas blancas en el dorso, la base del capítulo es de forma hexagonal, posee ojos, festones y la parte dorsal es puntiforme; presentan dimorfismo sexual caracterizado por el escudo, en los machos se extiende por todo el dorso, en cambio en las hembras sólo cubren la mitad del mismo, debido a la expansión del abdomen al quedar repletas de sangre (Olmeda, 1992; Smith & Whitman, 1992; Barriga, 2002). Las hembras repletas miden 12 milímetros de longitud, presentan el abdomen de color azul grisáceo a verde olivo (Carpenter *et al.*, 1990; Smith & Whitman, 1992). Las larvas son de color rojizo claro y miden 2 milímetros de ancho, las ninfas miden aproximadamente 3 milímetros de diámetro y son de color café a gris oscuro (Robinson, 2005).

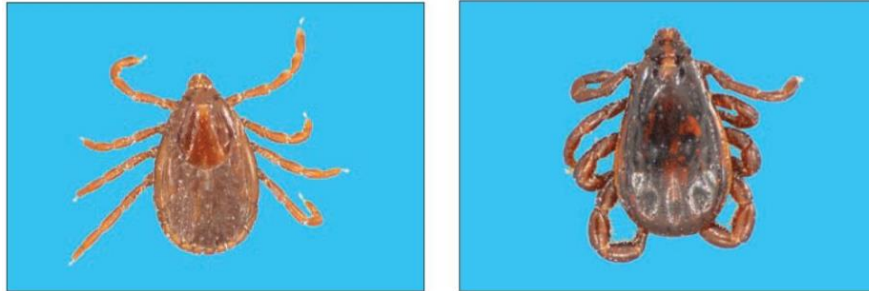


Figura 1 Hembra (izquierda) y macho (derecha) de *R. sanguineus* (Goddard & Layton, 2006).

1.4.2 Distribución de *R. sanguineus*

R. sanguineus se considera la garrapata con mayor distribución mundial, puede encontrarse entre los 50° latitud norte y 35° latitud sur (Alcaíno, 1985). Es originaria de África y se ha extendido en gran parte del mundo; ha aumentado sus poblaciones en las zonas urbanas, debido al aumento de perros domésticos y otras mascotas (Robinson, 2005). Probablemente es la garrapata más ampliamente distribuida, que se encuentra en casi todo el mundo; se localiza por toda Eurasia, África, Australia y en la mayor parte del continente Americano (Robinson, 2005; Dantas-Torres, 2008).

En 1907, Hunter y Hooker, encontraron a la garrapata *R. sanguineus* en Durango, México; a partir de entonces se ha encontrado en los estados de Baja California, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Guerrero, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas. Se encuentra también en los Estados de Aguascalientes, Campeche, Guanajuato, Hidalgo, México, Puebla, Querétaro, Tabasco, Tlaxcala y en Quintana Roo. Las garrapatas colectadas tienen como hospederos a los perros, ganado vacuno, equino, cueros, gatos, conejos, puma, serpientes y al hombre (Hoffmann, 1962).

En la Comarca Lagunera fue colectado por primera vez en Tlahualilo, Durango en 1907 por Hunter y Hooker; posteriormente se encontró en el año 1923 en las orejas de perros en Torreón, Saltillo (Coahuila) y Gómez Palacio (Durango). En 1945, se colectaron ejemplares de *R. sanguineus* sobre perros de los ejidos: Nazareno, Jalisco, Zaragoza y la Flor de Jimulco; pertenecientes a la Región

Lagunera (Coahuila y Durango). Durante los años 1951, 1952 y 1956 se colectaron en Torreón, Parras (Coahuila), Gómez Palacio, Durango (Durango) y otros sitios de la Región Lagunera (Hoffmann, 1962).

1.4.3 Ciclo biológico de *R. sanguineus*

R. sanguineus tiene un ciclo de vida parasitaria que se desarrolla sobre el hospedero y un ciclo de vida libre que se cumple en el ambiente fuera del vertebrado; por lo tanto necesita de tres hospederos para completar su ciclo de desarrollo. Su ciclo biológico está conformado por huevo, larva, ninfa y adulto, en cada etapa se alimenta del hospedero y se deja caer al suelo. (Alcaíno, 1985; Lord, 2007; Dantas-Torres, 2008). La hembra adulta se alimenta del hospedero durante 5 ó 21 días; durante este periodo son fecundadas por los machos, después abandonan al hospedero y buscan un lugar aislado para ovipositar; (Alcaíno, 1985; Lord, 2007).

1.4.4. Importancia médica

Las garrapatas *R. sanguineus* afectan de manera directa o indirecta la salud del hospedero; las larvas, ninfas y adultos se alimentan de sangre de perros y ocasionalmente de sangre humana (Alcaíno *et al.*, 1990). El daño directo puede realizarse de forma expoliatriz, mecánica y tóxica; la acción expoliatriz consiste en la sustracción de sangre del hospedante; la acción mecánica se genera al introducir el aparato bucal a través de la piel causando lesiones y la acción tóxica puede causar una parálisis (Barriga, 2002).

La hematofagia obligada, su ciclo de vida largo y la facilidad que desarrollan muchos protozoarios al pasar una parte de su ciclo de vida en el tubo digestivo y en las glándulas salivales de las garrapatas, las convierte en vectores biológicos o mecánicos de patógenos, que ocasionan enfermedades en animales y humanos (Barriga, 2002; Okoli *et al.*, 2006; Lord, 2007).

2. Transmisión de patógenos por garrapatas

La transmisión de patógenos por garrapatas es compleja (Lane, 1994); debido a

diversos factores que afectan la capacidad para adquirir, mantener y transmitir bacterias, virus, rickettsias y protozoarios como se observa en el Cuadro 2 (McHugh, 1994).

Cuadro 2 Enfermedades ocasionadas por patógenos transmitidos por garrapatas según Goddard (2007).

Enfermedad	Agente causal	Lugares donde se presenta	Garrapatas vectores
Enfermedad de Lyme	Espiroqueta	Europa, Japón, China, Australia, Estados Unidos.	<i>Ixodes ricinus</i> Linneo, <i>Ixodes scapularis</i> Say, <i>I. pacificus</i> Cooley & Kohls
Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas	Rickettsia	Canadá, Estados Unidos, México, Centro y Sudamérica	<i>Dermacentor variabilis</i> Say, <i>D. andersoni</i> Stiles, <i>Amblyoma cajennense</i> Fabricius
Tifus Siberiano por garrapatas	Rickettsia	Rusia asiática, algunas islas del mar de Japón,	<i>Dermacentor marginatus</i> Sulzer, <i>D. silvarum</i> Olenov, <i>D. nuttalli</i> Olenov
Fiebre botonosa	Rickettsia	Sur de Europa, área del Mediterráneo, India y África.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Latreille, <i>R. appendiculatus</i> Neumann, <i>Haemaphysalis leachi</i> Audouin.
Fiebre Botonosa Americana	Rickettsia	Centro sur y sur de Estados Unidos, otras partes de Sudamérica	<i>Amblyomma maculatum</i> Koch, <i>A. triste</i> Koch
Tularemia	Bacteria	Europa, Rusia, Japón, Canadá, Estados Unidos y México.	<i>Amblyomma americanum</i> Linneo, <i>D. variabilis</i> , <i>D. nuttalli</i> Dönitz, <i>I. ricinus</i> .
Fiebre de Colorado	Virus	Colombia Británica (Canadá) y Oeste de Estados Unidos	<i>D. andersoni</i>
Ehrliquisis y Anaplasmosis	Rickettsiae (Ehrlichia y Anaplasma)	Este y centro de Estados Unidos.	<i>A. americanum</i> , <i>Ixodes scapularis</i>
Babesiosis Americana	Protozoario	Massachusetts y Nueva York.	<i>I. scapularis</i>
Fiebre recurrente	espiroqueta	En casi todo el mundo, Washington, Oregon, California (E. U.)	<i>Ornithodoros</i> spp., <i>O. hermsi</i>
Encefalitis	Virus	Este y Oeste de Europa, el virus de Powassan está en Estados Unidos	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> Schulze, <i>D. marginatus</i> .
Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo	Virus	Europa, Asia y África	<i>Hyalomma marginatum</i> Koch, <i>H. anatolicum</i> Koch
Enfermedad selvática de Kyasanur	Virus	India, principalmente el estado de Karnataka	<i>Haemaphysalis spinigera</i> Neumann
Parálisis	Toxina salival	Australia; Montana, Columbia británica (Canadá) y Estados Unidos.	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>Ixodes holocyclus</i> Neumann

2.1 Clasificación del género *Rickettsia*

Las especies del género *Rickettsia* se han clasificado basados en la garrapata vector y su respuesta inmunológica en tres biotipos o grupos: Grupo Tifus, Grupo de las Fiebres Manchadas o Maculosas y el Grupo Tifus de los Matorrales. Éste último que se sacó del género *Rickettsia* y se reclasificó en un nuevo género denominado *Orientia*, quedando *O. tsutsugamushi* como única especie (Tamura *et al.*, 1995; La Scola y Raoult, 1997). Posteriormente se anexó el grupo de las Ehrlichiosis, originando nuevamente los grupos del Tifus, las Fiebres Manchadas y la Ehrlichiosis (Madigan *et al.*, 2006).

Las especies del Grupo Tifus se encuentran en el citoplasma de las células y las del grupo de las Fiebres Manchadas se encuentran en el núcleo (Jawetz & Adelberg, 1996), ambas tienen unidad filogenética, son parásitos intracelulares obligados (Feng & Walker, 2000) y son capaces de moverse intra e intercelularmente (Valbuena *et al.*, 2002), propiciando polimerizar la actina; ambas se desarrollan mejor cuando el metabolismo de las células del hospedero es bajo; por ello, su desarrollo se intensifica cuando la temperatura desciende de 32 °C (Jawetz & Adelberg, 1996).

2.2. *Rickettsias* del Grupo de las Fiebres Manchadas

Existen diversas especies de rickettsias del Grupo de las fiebres Manchadas (cuadro 3), conformadas por 20 agentes patógenos y otras 21 de baja o nula patogenicidad para los humanos (Raoult & Olson, 1999).

Cuadro 3: Rickettsias del Grupo de las Fiebres Manchadas (Raoult & Olson, 1999).

Tipo de Rickettsia	Enfermedad	Garrapata o ácaro vector	Distribución
<i>R. rickettsii</i> (Wolbach) Brumpt	Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas	<i>Dermacentor variabilis</i> , <i>D. andersoni</i>	Hemisferio Oeste
<i>R. conorii</i> Brumpt	Fiebre botonosa	Garrapatas del género <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> y <i>Haemaphysalis</i> .	África, área del mediterráneo, Medio Oriente.
<i>R. parkeri</i> Lackman	Fiebre botonosa americana	<i>Amblyomma maculatum</i> , <i>A. americanum</i> , <i>A. tristii</i> .	Costa Oriental y sureste de Estados Unidos, Oklahoma y Sudamérica.
<i>R. africae</i> Kelly	Fiebre Africana por mordedura de garrapata	<i>Amblyomma hebraeum</i>	África subsahariana
<i>R. sibirica</i> Zdrodovskii	Tifus del Norte de Asia o Siberiano	Garrapatas de género <i>Dermacentor</i> e <i>Hyalomma</i>	Asia central, Siberia, Mongolia.
<i>R. australis</i> Philip	Tifus por garrapatas de Queensland	<i>Ixodes holocyclus</i>	Australia
<i>R. akari</i> Huebner	Rickettsiosis pustulosa	Ácaro <i>Liponyssoides sanguineus</i>	Estados Unidos, posiblemente Rusia y África.
<i>R. japónica</i> Uchida	Fiebre Manchada Japonesa	Probablemente <i>Haemaphysalis flava</i> , <i>H. longicornis</i> e <i>Ixodes ovatus</i>	Japón
<i>R. mongolotimonae</i> Huber & Stette		Género <i>Hyalomma</i>	China, Europa, África
<i>R. aeschlimannii</i> Beati		<i>Hyalomma marginatum</i>	África
<i>R. honei</i> Stenos		Género <i>Ixodes</i> , <i>Rhipicephalus</i> y <i>Amblyomma</i>	Australia, Suroeste de Asia y Estados Unidos.

2.2.1 *Rickettsia rickettsii*

Rickettsia rickettsii es un cocobacilo intracelular obligado gram-negativo de la familia Rickettsiaceae (Zavala-Velázquez *et al.*, 1999), tiene forma bacilar lanceolada y con frecuencia aparece en parejas, mide de 0.2 a 0.3 micras de ancho y una micra de largo; se encuentra en el citoplasma de las células infectadas en grandes masas en forma cocoide (Merchant & Racker, 1980).

Enfermedades ocasionadas por rickettsias

Existen numerosas enfermedades ocasionadas por rickettsias, entre ellas La Fiebre Botonosa causada por *Rickettsia conorii* (Goddard, 2007), la Fiebre

Botonosa Americana ocasionada por *Rickettsia parkeri* (Paddock *et al.*, 2004), la Fiebre Africana por *Rickettsia africae* (Kelly *et al.*, 1996); el Tifus Siberiano por *Rickettsia sibirica*, el Tifus de Queensland por *Rickettsia australis* (Goddard, 2007) y la Fiebre Manchada o Maculosa ocasionada por *Rickettsia rickettsii* (Drage, 1999).

2.3 Fiebre Manchada en México

La bacteria *R. rickettsii* que ocasiona la Fiebre Manchada, puede estar presente en garrapatas sanas y se transmite por garrapatas infectadas al morder roedores, venados, al hombre u otros mamíferos; los principales vectores en México son: *R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense* y *Dermacentor variabilis* (NOM-EM-001-SSA2, 1999). Los primeros informes médicos sobre Fiebre Manchada en México datan de 1903 cuando hubo referencia de algunos casos que se presentaron en el Estado de Sinaloa; en 1925 Carlos Hoffmann publicó "La fiebre manchada de Choix", tomando como base argumentos de los médicos Ocaranza y Alcaraz ocurridos en Los Mochis, Sinaloa. Para este estudio se colectaron varios lotes de garrapatas sobre perros que vivían en las casas donde se habían presentado casos de Fiebre Manchada; Carlos Hoffmann identificó a las garrapatas como *Rhipicephalus sanguineus* y con las hembras realizó cultivos para experimentar la "transmisión de gérmenes eventuales sobre el perro", pero obtuvo resultados negativos (Hoffmann, 1962).

Desde 1930 a 1950, se presentaron casos clínicos confirmados de Fiebre Manchada relacionados a la garrapata *R. sanguineus* como vector en los estados de Baja California, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora (Bustamante y Varela, 1944; Labruna *et al.*, 2011). En 1940, la fiebre de Choix causó 19 casos de Fiebre Manchada con 13 defunciones en el Distrito de Choix; en 1941 se presentaron 32 casos, en 1942 hubo 30 defunciones en El Fuerte Sinaloa y 79 casos con 50 defunciones en Álamos, Sonora.

Posteriormente el Dr. Alberto Tripp Flores diagnosticó "fiebre pinta," en un paciente del rancho El Tunal en el Fuerte, Sinaloa (Bustamante y Varela, 1944).

A partir de 1944, se demostró que el transmisor de la fiebre manchada en México era *R. sanguineus*; en Estados Unidos se creía que podría tratarse de otra especie o subespecie diferente a *Dermacentor* porque *R. sanguineus* en ese país no penetra a las habitaciones ni es una especie que ataca normalmente al hombre. Para corroborar, se enviaron varios ejemplares determinados en México como *R. sanguineus* al Rocky Mountain Laboratory de Estados Unidos, los cuales corroboraron esta especie (Hoffmann, 1962).

En Nuevo León se encontró a la bacteria *R. rickettsii* en la garrapata *Amblyomma imitator* Kohls y en Veracruz en *A. cajennense*. En Yucatán también se ha reportado un caso relacionado a *R. rickettsii* pero se desconoce el vector (Zavala-Velázquez *et al.*, 1996; Labruna *et al.*, 2011). En 1993, se realizaron estudios en los estados de Yucatán y Jalisco con pacientes sospechosos de padecer dengue y los resultados serológicos mostraron que 40% de los casos eran positivos a Fiebre Manchada (Zavala-Velázquez *et al.*, 1999).

En México existe una deficiencia en el control de la Fiebre Manchada, los factores ecológicos y epidemiológicos responsables de la mayor transmisión periódica de *R. rickettsii* por las garrapatas a los seres humanos no se han determinado; para detectarla se necesita una prueba de diagnóstico que sea efectivo al principio de la enfermedad y que esté ampliamente disponible. El diagnóstico rickettsial por Inmunohistoquímica y PCR están disponibles en pocos laboratorios de referencia; donde el diagnóstico oportuno y el tratamiento empírico se realizan con doxiciclina (Zavala-Castro *et al.*, 2004).

2.3.1 Fiebre Manchada en la Comarca Lagunera

La Comarca Lagunera cuenta con las condiciones ambientales para que el vector de la Fiebre Manchada se desarrolle y permanezca en el área semidesértica; los habitantes conviven con gran cantidad de perros y hay viviendas construidas de adobe con piso de tierra. En ésta región la garrapata *R. sanguineus* carece relativamente de enemigos naturales, lo que propicia su establecimiento como vector potencial del patógeno que ocasiona la Fiebre Manchada (SAGAR, 1996).

En 1945, el Servicio de Medicina Social e Higiene Rural notificó casos atípicos sospechosos de fiebre manchada a la dirección General de Epidemiología; del diagnóstico resultó un caso positivo a fiebre manchada. En ese mismo año se obtuvieron muestras de sangre de personas sospechosas de fiebre manchada, así mismo extrajeron muestras de sangre de perros y se capturaron 16 lotes de garrapatas. Las garrapatas se identificaron y clasificaron en el Laboratorio de Entomología por Ana Esther Hoffman como *R. sanguineus* y *Otobius megnini* Dugès; las muestras de sangre se enviaron al Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales y al Army Medical Center (Washington, D. C.) donde se realizaron pruebas con antígenos de Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas (Bustamante *et al.*, 1946).

En el año de 1946, en la Comarca Lagunera de Coahuila y Durango, se aislaron dos cepas de rickettsia tipo oeste de la garrapata café del perro *R. sanguineus*; las garrapatas fueron capturados en paredes de adobe y piso de tierra en el Ejido Granada (Matamoros, Coahuila) y las otras muestras se colectaron de un perro en el Ejido Zaragoza (Torreón, Coah.). Así mismo se analizaron dos muestras de sangre humana y dos muestras de suero de perros, ambas dieron positivo a Fiebre Manchada (Bustamante *et al.*, 1946).

Desde 1975 al año 2007, registraron 115 casos de Fiebre Manchada y 54 muertes en Torreón (De Lara y Cárdenas, 2008); dentro del cual están irmersos los casos ocurridos durante los años 1990 al 2000, donde se reportaron 34 casos positivos de Fiebre Manchada en la Comarca Lagunera. Para el año 2011 se presentaron 7 casos en el estado de Coahuila, de los cuales 2 sucedieron en Torreón; durante los años 2012 y 2013 se documentaron 75 y 46 casos respectivamente; en lo que va del año 2014 se han presentado 2 decesos de los 60 casos estimados, todos ellos relacionados a Fiebre Manchada (SINAVE, 2014).

ARTÍCULOS

DETECCIÓN DE *Rickettsia* sp. EN LA GARRAPATA CAFÉ DEL PERRO *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) EN MATAMOROS, COAHUILA, MÉXICO.

DETECTION OF *Rickettsia* sp. IN BROWN DOG TICK *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) OF MATAMOROS, COAHUILA, MEXICO.

Rickettsia sp. EN *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) EN MATAMOROS, COAHUILA; MÉXICO.

Antonio Castillo-Martínez¹, Sarai Monserrat Cueto-Medina¹, Sergio Hernández-Rodríguez¹, Miguel Ángel Gallegos-Robles², Ma. Teresa Valdes-Perezgasga¹, Francisco Javier Sánchez-Ramos^{1*}, Aldo Iván Ortega-Morales¹

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Periférico Raúl López Sánchez CP. 27054. Tel. 01 (871) 7297613. acm_sultan@hotmail.com; sary_cueto@hotmail.com, sergiohr39@hotmail.com; cebolla_55@hotmail.com; *fjsr1958@hotmail.com; agrortega@hotmail.com.

²Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Km. 35 Carretera Gómez Palacio- Tlahualilo. Domicilio Conocido, Venecia, Gómez Palacio, Durango, México. CP 35170. Tel. 01 (871) 7118918. garoma64@hotmail.com

*Autor para correspondencia

RESUMEN

Se colectaron al azar 217 garrapatas sobre 72 perros domésticos en el municipio de Matamoros, Coahuila, éstas fueron identificadas como *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. Con la intención de determinar la presencia de la bacteria (*Rickettsia* sp.) causante de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), las garrapatas se agruparon en muestras (n=100) para pruebas moleculares, las hembras repletas de sangre fueron diseccionadas para obtener el contenido estomacal y los órganos internos. Las ninfas y los machos se maceraron para exponer el contenido interno. Empleando la técnica de CTAB se obtuvo ADN de cada pool, el cual fue sometido a ensayos de PCR para amplificar el gen *gltA* para la detección de *Rickettsias*. Se reporta la presencia de *Rickettsia* sp. en una frecuencia del 4% (4). El presente trabajo constituye el primer registro del agente causal de la fiebre manchada *Rickettsia* sp. en órganos internos de la garrapata café del perro, *R. sanguineus* a través de técnicas moleculares en el municipio de Matamoros, Coahuila, región endémica de esta enfermedad.

PALABRAS CLAVE: *Rickettsia* spp., PCR, garrapatas, *gltA*

ABSTRACT

Two hundred and seventeen ticks randomly collected from seventy two domestic dogs, in Matamoros municipality, Coahuila, these were taxonomically identified as *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. In order to determine *Rickettsia* sp. presence in ticks these were grouped in 100 pools for molecular testing. Engorged female ticks were dissected to obtain pellets containing internal organs and haemolymph. Nymphs and males were triturated for exposing internal contents from which DNA was extracted by the CTAB technique and subjected to PCR to amplify the *gltA* gene for detection of *Rickettsia*. The frequency for *Rickettsia* sp. was 4% (4). The present work constitutes the first record of the causative agent of the spotted fever *Rickettsia* sp. in internal organs of brown dog tick *R. sanguineus* through molecular techniques in Matamoros municipality, Coahuila, endemic region of this disease.

KEY WORDS: *Rickettsia* spp., PCR, ticks, *gltA*

INTRODUCCIÓN

La garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* puede ser vector de *Rickettsia rickettsii*, agente causante de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), cuando se alimentan de la sangre de animales domésticos y silvestres, además del hombre (Jawetz & Adelberg 1996; Quinn & Markey 2003). Los hospederos se infectan cuando las garrapatas infectivas inoculan *Rickettsias* al torrente sanguíneo junto con la saliva que regurgitan. El contacto con los aerosoles que se generan con garrapatas aplastadas o con animales infectados de *Rickettsias*, pueden ser medios de infección cuando se exponen heridas externas u otras laceraciones (Merchant & Racker 1980). En México, América Central y Sudamérica la Fiebre Manchada es considerada una enfermedad reemergente (Hidalgo et al. 2007) y que ocasiona mayor morbilidad en el norte de México (SINAVE 2013), donde el vector principal de *R. rickettsii* es *R. sanguineus* (Bustamante & Varela 1946, Hoffmann 1962, Labruna et al. 2011).

En la región política conocida como Comarca Lagunera (CL) en los estados de Coahuila y Durango existen las condiciones ambientales, geográficas, demográficas, epidemiológicas y socioeconómicas (marginación y pobreza) para el establecimiento de poblaciones de garrapatas, en donde se han reportado grandes números de ellas en reportes previos (DGSA-SAGAR 1996). En la Comarca Lagunera los casos de Fiebre Manchada se han atribuido a *R. sanguineus* como vector de *R. rickettsii* (Labruna et al. 2011). En el municipio de Matamoros, Coahuila existen viviendas construidas de adobe con piso de tierra y los habitantes conviven con gran cantidad de perros (NOM-EM-001-SSA2 1999). En 1945, se notificaron casos humanos positivos a fiebre manchada en el Ejido Jimulco (Torreón, Coah.), en 1946 se aislaron dos cepas de rickettsia en garrapatas *R. sanguineus* provenientes del Ejido Granada (Matamoros, Coahuila) y del Ejido Zaragoza (Torreón, Coah.); se analizaron muestras de sangre humana y suero de perro que resultaron positivos a Fiebre Manchada (Bustamante et al. 1946). Desde 1975 al año 2007, se registraron 115 casos de Fiebre Manchada en Torreón (De Lara y Cárdenas 2008); dentro del cual

están inmersos los casos del periodo 1990-2000, donde se reportaron 34 casos para la Comarca Lagunera. En el año 2011 se presentaron siete casos en el estado de Coahuila, de los cuales dos sucedieron en Torreón; durante los años 2012-2013 se documentaron 75 y 46 casos humanos respectivamente en la CL, donde uno de ellos se presentó en el ejido La Atalaya (SINAVE 2013; 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de garrapatas se realizó en La Atalaya y el Cambio pertenecientes al municipio de Matamoros, Coahuila; el cual está ubicado entre los paralelos 25° 23' y 25° 48' de latitud norte, con los meridianos 103° 23' y 103° 03' de longitud oeste. Con una elevación media de 1,110 metros sobre el nivel del mar (INEGI 2014). Las garrapatas en todos sus estados de vida a excepción del huevo, fueron colectadas durante los meses de junio a noviembre del 2013. Un total de 217 garrapatas fueron colectadas directamente sobre 72 perros domésticos, las cuales se obtuvieron del hospedero evitando el desprendimiento del gnatosoma. Las garrapatas se preservaron en etanol al 70% en viales de 2 ml. Estas fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, en donde se lavaron con agua ultrapura y posteriormente se conservaron en etanol al 96% en viales de 1.5 ml. Todos los especímenes fueron consistentes con la descripción de *R. sanguineus* (Walker et al. 2000). Para exponer el contenido interno de cada garrapata, se diseccionaron con tijeras Iris de disección (BioQuip No. 4715) previamente esterilizadas realizando un corte dorsoventral desde la base de los palpos hasta la parte posterior del idiosoma. Una vez expuesto el contenido interno, se retiró del exoesqueleto sujetándolo con pinzas entomológicas (BioQuip No. 4531) para colocarlo en un vial de 1.5 ml en seco. El contenido intestinal, así como los machos e inmaduros se maceraron individualmente usando pistilos de maceración de tejido (Thomas Scientific No. TS0913X70) en un medio líquido de agua milli-Q (Life Invitrogen, USA). Los productos macerados se agruparon por muestras (n=100) a

razón de 1 muestra = 1 ♀ adulta (1 contenido intestinal a repleción, sin exoesqueleto); 2 ♂ adultos completos (incluyendo exoesqueleto); 4 ♀ / ♂ especímenes inmaduros completos incluyendo exoesqueleto (Cuadro 1).

PRUEBAS MOLECULARES

La extracción de ADN se realizó siguiendo la técnica de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide o CTAB (Doyle & Doyle 1987), el cual fue evaluado en calidad y cantidad por medio de nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000). El ADN obtenido se resuspendió en 20 µl de buffer TE 1X [400 µl EDTA (Life Invitrogen, USA) + 4 ml Tris Base (Bio Basic Canada Inc.)] y se almacenó a -20 °C. Para los ensayos PCR se usó un primer genérico para *Rickettsia* spp: Forward: RpCS.877p GGGGGCCTGCTCACGGCGG, Reverse: RpCS.1258n ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA (Regnery et al. 1991), el cual amplifica en un rango de 380-397 pb el gen *gltA* de la citrato sintasa (Wood et al. 1987). Las reacciones de PCR contuvieron 20 pmoles de los iniciadores dNTP's (Life Invitrogen, USA) a una concentración de 1.5 mM, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Life Invitrogen, USA), 3 µl de Buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 Bio Basic Canada Inc.), 500 mg KCl, 10-200 ng de ADN templado y Agua Mili-Q (Life Invitrogen, USA) para completar un volumen de 100 µl. Para el gen *gltA*, (Cuadro 2), las condiciones del termociclador Select Cyclor II (Select BioProducts, USA) fueron: un ciclo a 95 °C (1 minuto), 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C (20 segundos), alineación de iniciadores a 48 °C (30 segundos), extensión a 60 °C (2 minutos) y extensión final a 72 °C (1 min). Los productos de PCR, el control positivo y el marcador de peso molecular hyperladder 100-pb (Bioline, USA), fueron visualizados en gel de agarosa al 1% y teñidos con Gel Red (Biotium TM, USA); la imagen de los productos se capturó en un fotodocumentador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems).

RESULTADOS

Se obtuvieron 4 muestras positivas para *Rickettsia* sp., en donde el 4% (4/100) de las muestras correspondieron a garrapatas hembras (Cuadro 3). La presencia de *Rickettsia* sp. en los órganos

internos macerados de las muestras de garrapatas fue determinada mediante PCR amplificando los genes *gltA* derivados de los primers RpCS.877p y RpCS.1258n con un rango de 380-397 pb (Fig. 1).



Cuadro 3. Garrapatas recolectadas en dos localidades del Municipio de Matamoros, Coahuila.

Municipio	Localidad	Sexo			Lotes= muestras		
		♂	♀	Ninfas	♂	♀	Ninfas
Matamoros	La Atalaya	18	29	52	9	29	13
	El Cambio	24	18	76	12	18	19

Figura 1. Productos de PCR del gen *gltA* de *Rickettsia* a partir de ADN obtenido de garrapatas A. Líneas 1-12 = garrapatas colectadas en ejido La Atalaya. M= marcador molecular 100-1000 pb, + = Control positivo, - = Control negativo sin ADN. Fragmento observado de 380-397 pb.

DISCUSIÓN

En las áreas rurales del municipio de Matamoros, Coahuila, México; la especie de garrapata más abundante y frecuente en perros domésticos es la garrapata café del perro *R. sanguineus* y en menor proporción las garrapatas del género *Otobius*, postulando la hipótesis que esta especie de garrapata podría estar involucrada en el ciclo de transmisión de la enfermedad (Bustamante & Varela 1946, Hoffmann 1962, Labruna et al. 2011) debido al aislamiento de una cepa de rickettsia en *R. sanguineus* colectada en el Ejido Granada (Bustamante et al. 1946), comunidad que se ubica a 1.5 km del Ejido La Atalaya (INEGI 2014), donde recientemente se presentó un caso humano confirmado de Fiebre Manchada (SINAVE 2013), asociado a la garrapata antes mencionada.

R. sanguineus es vector de bacterias, entre ellas las rickettsias (Bruning 1996), en este estudio se

extrajeron y maceraron los órganos internos de las garrapatas y con el método PCR se detectaron cuatro muestras positivas al género *Rickettsia* sp. mediante la amplificación por PCR del gen *gltA*, lo cual se consigna a lo reportado por Fernández (2003) quien utilizó los primers de Regnery et al. (1991); pero con diferencias en el método de maceración y extracción de ADN utilizadas en este estudio, los cuales permitieron una mejor manipulación de los órganos internos de las garrapatas y redujeron la cantidad de sustancias inhibidoras de la PCR. Los resultados concuerdan con Demma et al. (2005) quien menciona que no todas las especies de garrapatas son vectores del patógeno y sólo del 1 al 5% están infectados por rickettsias. Así mismo el área rural concuerda con las características descritas por DGSA-SAGAR (1996) quien refiere a la CL como una zona con las condiciones ambientales para que el vector y el patógeno se desarrollen y permanezcan en el área semidesértica, donde los habitantes conviven con gran cantidad de perros en viviendas construidas de adobe con piso de tierra.

LITERATURA CITADA

Bruning, A. 1996. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, 152:139-151.

Bustamante, M. E., G. Varela & O.C. Mariotte. 1946. Estudios de fiebre manchada en México. Fiebre manchada en la Laguna. *Revista Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 7: 39-48.

Bustamante, M.G. & G. Varela. 1946. Estudios de Fiebre Manchada en México: Hallazgo de *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado, en Veracruz. *Revista Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 7: 75-78.

De Lara, H. J. & B. R. Cárdenas. 2008. Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en pediatría. Revisión clínica de una serie de 115 casos. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*, 22(85): 4-9.

Demma, L. J., M. S. Traeger, W. L. Nicholson, C. D. Paddock, D. M. Blau, M. E. Ereemeeva, G. A. Dasch, M. L. Levin, J. Singleton, S. R. Zaki, J. E. Cheek, D. L. Swerdlow & J. H. McQuiston. 2005. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *New England Journal of Medicine*, 353(6): 587-594.

Dirección General de Salud Animal: DGSA-SAGAR. 1996. Manual de identificación de las especies de garrapatas de importancia en México del Centro nacional de servicios de constatación de la Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. [En línea] <http://www.senasica.gob.mx/?id=2803>. [Fecha de consulta 16/Enero/2014].

Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

Fernández, S. 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. 296 pp.

Hidalgo, M. L. Orejuela, P. Fuya, P. Carrillo, J. Hernández & E. Parra. 2007. Rocky Mountain spotted fever, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1058-1060.

Hoffman, A. 1962. Monografía de los Ixodoidea de Mexico: parte I. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia*, 23:191.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2014. Información Nacional por Entidad Federativa y Municipios. [En línea] <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx>. [Fecha de consulta 19/Febrero/2014].

Jawetz, E. M. & E. Adelberg. 1996. *Microbiología clínica. 15ª. Manual moderno*. México, D.F. 783 pp.

Labruna, M. M. Ogrzewalska, J. Soares, T. Martins, H. Soares, J. Moraes-Filho, F. Nieri-Bastos, A. Almeida, & A. Pinter. 2011. Experimental Infection of Ticks with *R. rickettsii*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5): 829-834.

Merchant, I. A. & R. A. Racker 1980. *Bacteriología y virología Veterinarias*. 3ª. Acribia. Zaragoza, España. pp. 517-522.

NOM-EM-001-SSA2. 1999. NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SSA2-1999, Para la vigilancia, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 47 pp. Quinn, P. J. & B. K. Markey, 2003. Concise review of veterinary microbiology. 1ª. Blackwell Publishing. Oxford, UK. pp. 133-135.

Regnery, R. L., C. L. Spruill & B. D. Plikatys. 1991. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraespecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal Bacteriology*, 173: 1576-89.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2014. Anuarios de Morbilidad: Fiebre Manchada. [En línea] <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. [Fecha de consulta 19/ mayo/ 2014].

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2013. Casos de rickettsiosis en la Jurisdicción Sanitaria No. 6 de Torreón, Coahuila. [En línea] <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. [Fecha de consulta 19/ Febrero/ 2014].

Walker, J., J. Keirans & I. Horak. 2000. *The genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world*. 1ª. Cambridge University. Cambridge, UK. 628 pp.

Wood, D. O., L. R. Williamson, H. H. Winkler & D. C. Krause. 1987. Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene. *Journal of Bacteriology*, 169: 3564-3572.

Detección de *Rickettsia rickettsii* Brump (Rickettsiales: Rickettsiaceae) en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Ixodida: Ixodidae) en la Comarca Lagunera, zona reemergente de Fiebre Manchada en México.

Antonio Castillo-Martínez¹, Sarai M. Cueto-Medina¹, María Teresa Valdés-Perezgasga¹, Francisco J. Sánchez-Ramos¹, Javier López-Hernández¹, Sergio Hernández-Rodríguez¹ & Aldo I. Ortega-Morales¹.

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Departamento de Parasitología. Periférico Raúl López Sánchez s/n, col. Valle Verde, CP. 27054. Torreón, Coahuila, México. Tel. 01 (871) 7297613. acm_sultan@hotmail.com; sary_cueto@hotmail.com, cebolla_55@hotmail.com; fjsr1958@hotmail.com; *sergiohr39@hotmail.com; marjav61@hotmail.com, agrortega@hotmail.com.

*Autor para correspondencia

Rickettsia rickettsii en *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida: Ixodidae) de zonas rurales de Coahuila y Durango, México.

Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S.M., Valdés-Perezgasga, M.T., Sánchez-Ramos, F.J., López-Hernández, J., Hernández-Rodríguez, S. & Ortega-Morales, A.I.

Detección de *Rickettsia rickettsii* Brumpt (Rickettsiales: Rickettsiaceae) en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Ixodida: Ixodidae) en la Comarca Lagunera, zona reemergente de Fiebre Manchada en México.

Detection of *Rickettsia rickettsii* Brumpt (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Ixodida: Ixodidae) at the Comarca Lagunera, a reemergent Spotted Fever zone in Mexico.

Detección de *Rickettsia rickettsii* Brumpt (Rickettsiales: Rickettsiaceae) en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Ixodida: Ixodidae) en la Comarca Lagunera, zona reemergente de Fiebre Manchada en México.

RESUMEN

La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas es una enfermedad reemergente en la Comarca Lagunera, ya que en los últimos años se han reportado numerosos casos en pacientes humanos. Para detectar la presencia de *Rickettsia rickettsii* (Brumpt, 1922) en garrapata café del perro, se realizaron colectas aisladas en siete áreas rurales y una área periurbana de la Comarca Lagunera de Coahuila y Durango durante junio 2015 a febrero 2016. Se colectaron de manera directa 840 garrapatas hembras a repleción sobre 168 perros domésticos (cinco garrapatas por perro), las cuales se depositaron en viales de 2 ml. Las garrapatas se llevaron al Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna donde se identificaron como *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Para el análisis molecular se eligieron al azar 3 garrapatas por muestra para conformar 195 pools, en cada uno de los cuales se realizó la extracción de órganos internos y contenido estomacal. Para obtener ADN de cada pool se empleó la técnica del CTAB, se amplificó el gen *gltA* mediante ensayos de PCR usando un termociclador y un iniciador genérico (Forward: RpCS.877p, Reverse: RpCS.1258n) para la detección de *Rickettsia* sp. Ocho pools resultaron positivos a *Rickettsia rickettsii* con una frecuencia del 6.9% (2/29) en la colonia Leticia Herrera (Gómez Palacio, Durango), un pool positivo (1/26= 3.85%) para Parras (Coahuila) y cinco pools para el municipio de Matamoros, Coahuila correspondientes a los ejidos Granada (2/28=7.1%), Alamito (1/23=4.35%), Consuelo (1/32= 3.13%) y Vizcaya (1/19=5.25%). Por medio de una secuenciación se obtuvo una identidad del 100% a la cepa Brasileña 647 (KJ588069.1) de *Rickettsia rickettsii* y 99% de similitud con las extracciones del InDRE (KU587806.1 y KT881097.1).

Palabras clave: *Rickettsia rickettsii*, Fiebre Manchada, garrapatas, técnica CTAB.

ABSTRACT

Rocky Mountain Spotted fever is a reemergent disease in the Comarca Lagunera, since numerous humans cases have been reported in the last few years. In order to detect the presence of *Rickettsia rickettsii* Brumpt in dog's brown ticks, single collections of ticks were conducted in seven rural areas and a periurban area in the Comarca Lagunera of Coahuila and Durango from June 2015 through February 2016. Direct collection of 840 engorged female ticks on 168 home dogs was carried out (5 ticks per dog), which were contained in two ml vials. Ticks were identified as *Rhipicephalus sanguineus* Latreille in the Parasitology Laboratory of the Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. For the molecular analysis three ticks per sample ticks were randomly selected, forming 195 pools. Each tick was subjected to extraction of internal organs and stomachal content. CTAB technique was used on each pool in order to obtain DNA, and for the detection of *Rickettsia* sp, *gltA* gene was amplified using PCR assays with thermocyclator and a generic primer (Forward: RpCS.844p, Reverse:RpCS. 1258n). Eight pools resulted positive *Rickettsia rickettsii* with a frequency of 6.9% (2/29) in the colony Leticia Herrera (Gomez Palacio, Durango), one (1/26= 3.85%) for Parras (Coahuila) and five pools for the municipality of Matamoros (Coahuila) in Granada (2/28=7.1%), Alamito (1/23=4.35%), Consuelo (1/32=3.13%) and Vizcaya (1/19=5.25%). By means of sequencing 100% identification for *Rickettsia rickettsii* Brazilian strain 647 (KJ588069.1) and 99% for InDRE strains (KU587806.1 and KT881097.1) were obtained.

Key words: *Rickettsia rickettsii*, spotted fever, ticks, CTAB technique.

ANTECEDENTES

La garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* Latreille implicada en la transmisión de Fiebre Manchada fue colectada en Tlahualilo (Hunter y Hooker, 1907), Gómez Palacio (Macías-Valadez, 1923), Pueblo Nuevo, Nazareno (Ortiz-Mariotte, 1945), Torreón (Bustamante et al. 1946; Silva-Goytia y Elizondo, 1952) y Durango (Varela y Aparicio, 1951); donde se encontró ectoparasitando perros y al interior de los hogares (Silva-Goytia y Elizondo, 1952). La presencia de *R. sanguineus* en esas localidades se asoció como vector de la bacteria que ocasiona la Fiebre Manchada (Bustamante y Varela 1947). Los primeros casos positivos a Fiebre Manchada en humanos se registraron en el ejido Jimulco (Ortiz-Mariotte 1945); posteriormente se presentaron otros casos en los ejidos Granada y Zaragoza ocasionados por mordedura de garrapatas *R. sanguineus* (Bustamante et al. 1946). Durante el lapso 1975-2007, se presentaron 115 padecimientos de Fiebre Manchada (De Lara y Cárdenas 2008), dos padecimientos humanos sucedieron en el año 2011 en Torreón y durante el periodo 2012-2014 se registraron 121 casos humanos de Fiebre Manchada para la Comarca Lagunera (SINAVE 2015). Bustamante et al. (1946) aislaron dos cepas de rickettsia en garrapatas *R. sanguineus*; otros investigadores realizaron estudios serológicos, donde encontraron anticuerpos de *R. rickettsii* en sueros humanos, de perros y garrapatas *R. sanguineus* con similitud a la cepa Bitter Root Valley (Silva-Goytia y Elizondo, 1953). Covarrubias et al. (2007), encontraron 10 muestras positivas a *Rickettsia rickettsii* mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en los municipios de San Pedro de las Colonias y Francisco I. Madero; mientras que Castillo-Martínez et al. (2014) registraron el hallazgo de 4 muestras positivas para *Rickettsia* sp. del ejido Atalaya obtenidas mediante PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta de garrapatas se realizó durante junio 2015 a febrero 2016 en seis localidades rurales del municipio de Matamoros (25°31'41.77''N, 103°13'55.38''W: 1116 msnm) y dos áreas periurbanas correspondientes a Parras de la Fuente (25°26'45.09''N, 102°10'48.82''W: 1512

msnm) y Gómez Palacio (25°34'52.46''N, 103°21'21.11''W: 1128 msnm), ubicadas en los estados de Coahuila y Durango como se muestra en la Figura 1 (INEGI 2016).

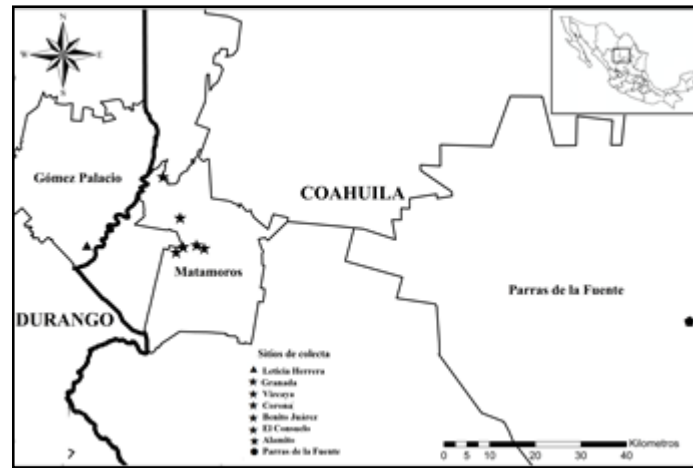


Figura 2. Áreas de la Comarca Lagunera (Coahuila y Durango) con presencia de *Rhipicephalus sanguineus* positivos a *Rickettsia rickettsii*.

Se colectaron de manera directa e intencionada para este estudio un total de 840 garrapatas (♀) alimentadas sobre 168 perros domiciliados y peridomiciliados, ambos con dueño, tomando una muestra de 5 garrapatas repletas por canino (Cuadro 1), evitando el desprendimiento del gnatosoma. Las garrapatas se colocaron en microtubos de 2 ml, se depositaron en un contenedor frío para su preservación y se transportaron al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Los ixódidos colectados se lavaron con agua ultrapura, posteriormente se colocaron bajo un microscopio estereoscópico para su identificación morfométrica siguiendo las claves taxonómicas de Walker et al. (2014).

Cuadro 4: Garrapatas (♀) *Rhipicephalus sanguineus* colectadas en ocho localidades de la Comarca Lagunera de Coahuila y Durango, México.

Área de colecta	Localidad	Ubicación	Garrapatas ♀
Matamoros Coahuila	Granada	25° 38' 26.08''N 103° 16' 01.63''W	116
	Vizcaya	25° 34' 49.15''N 103° 12' 49.89''W	105
	Corona	25° 34' 58.76''N 103° 15' 35.31''W	99
	Benito Juárez	25° 35' 11.9''N 103° 13' 50.91''W	95
	El Consuelo	25° 34' 19.81''N	103

		103° 16' 31.36''W	
	Alamito	25° 43' 19.01''N 103° 18' 21.31''W	107
Parras de la Fuente Coahuila	Parras de la Fuente	25° 26' 24.68''N 102° 09' 1.58''W	101
Gómez Palacio Durango	Leticia Herrera	25° 35' 1.64''N 103° 28' 14.8''W	114

Para extraer el contenido interno de cada muestra se eligieron al azar tres ejemplares a repleción; las garrapatas se diseccionaron con tijeras Iris de microdissección (BioQuip No. 4715) previamente esterilizadas realizando un corte en la parte posterior del abdomen, se sujetaron con unas pinzas entomológicas (BioQuip No. 4522) desde la base de los palpos y con ayuda de una pinza curva (BioQuip No. 4527) se deslizó presionando ligeramente la parte dorsal y ventral de los especímenes hasta la parte posterior del idiosoma. El contenido interno de cada muestra se depositó en un microtubo de 1.5 ml con un medio líquido de agua milli-Q (Life Invitrogen, USA) y se maceraron usando pistilos de maceración de tejido (Thomas Scientific No. TS0913X70). Los productos macerados (195 pools) se agruparon a razón de 1 muestra = 3♀ adultas a repleción (Cuadro 2).

Cuadro 5: Muestras de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, pools procesados y resultados de los análisis por PCR para la detección de *Rickettsia rickettsii*.

Localidad	No. de Garrapatas	No. de pools (3♀c/u)	Pools positivos	Pools negativos
Granada	84	28	2 (7.14 %)	26 (92.86 %)
Vizcaya	57	19	1 (5.26 %)	18 (94.74 %)
Corona	63	21	0	21 (100 %)
Benito Juárez	51	17	0	17 (100%)
El Consuelo	96	32	1 (3.13 %)	31 (96.87 %)
Alamito	69	23	1 (4.35 %)	22 (95.65 %)
Parras	78	26	1 (3.85 %)	25 (96.15 %)
Leticia Herrera	87	29	2 (6.90 %)	27 (93.10 %)

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide o CTAB (Doyle & Doyle 1987) con las siguientes modificaciones: a cada muestra macerada se agregaron 200µl de CTAB 2X, se mezclaron durante 15 seg en el vortex (Select vortexer, Select Bioproducts, U.S.A.), en seguida se colocaron los microtubos en el termobloque (Digital block

heater, Select Bioproducts U.S.A.) a 65 °C durante 30 min; posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo frío (C4425-12, Jalmek) y se mezclaron por 10 seg en el vortex. Las muestras se colocaron en una centrífuga (Force micro 1624, Select Bioproducts U.S.A.) durante 20 min a 13000 rpm, se transfirieron 120 µl de la fase acuosa a microtubos estériles de 1.5 ml, a las cuales se les adicionaron 200 µl de isopropanol frío (P6925-13, Jalmek) y se dejaron reposar durante 30 min a -30 °C para precipitar los ácidos nucleicos. Las muestras nuevamente se centrifugaron durante 20 min a 13000 rpm, se decantó el isopropanol para agregar 200 µl de etanol frío (E5325-15, Jalmek) al 70%, se realizó otra centrifugación por 10 min a 13 000 rpm; se decantó el etanol, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 40 min y finalmente se resuspendió el ADN en 30 µl de agua milli-Q (Life Invitrogen, USA).

Pruebas Moleculares

Se evaluó la calidad y cantidad de ADN obtenido por medio de nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000), se resuspendió en 20 µl de buffer TE 1X [400 µl EDTA (Life Invitrogen, USA) + 4 ml Tris Base (Bio Basic Canada Inc.)] para almacenarlo a -20 °C. Para las pruebas de PCR se utilizó el iniciador genérico que amplifica el gen *gltA* en un rango de 380-397 pb (Wood et al. 1987) para *Rickettsia* spp: Forward: RpCS.877p GGGGGCCTGCTCACGGCGG, Reverse: RpCS.1258n ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA (Regnery et al. 1991). La reacción de PCR se realizó con la siguiente mezcla de reacción: MgCl₂ a una concentración de 1.5 mM, buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 Bio Basic Canada Inc.), dNTP's (Life Invitrogen, USA) a una concentración de 0.2 mM, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Life Invitrogen, USA), ADN templado concentrado a 20-25 ng/µl, 20 pmol/ µl de cada uno de los iniciadores (RpCS.877p, RpCS.1258n) y agua milli-Q (Life Invitrogen, USA) para completar un Rx de 25 µl.

Las condiciones del termociclador Select Cyclor II (Select BioProducts, USA) para amplificar el gen *gltA* fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C durante un minuto, 35 ciclos conformados por tres procesos: desnaturalización a 95 °C (20 segundos), alineación de iniciadores a 48 °C por 30 segundos, una extensión a 60 °C (2 minutos) y otra extensión final a 72 °C (1 min). Como control

positivo se utilizó una muestra de *Rickettsia rickettsii* proporcionada por el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (UABC) y mezcla sin ADN para el control negativo. El marcador de peso molecular (Hyperladder 100-pb - Bioline, USA), el control positivo y los productos obtenidos de PCR fueron teñidos con Gel Red (Biotium TM, USA) y observados en gel de agarosa al 1%; para visualizar los resultados de los productos se empleó un fotodocumentador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems).

RESULTADOS

Todos los especímenes fueron consistentes con la descripción de *R. sanguineus* (Walker et al. 2014) y de éstas garrapatas se obtuvieron 8 pools positivos (8/195 = 4.1%) a *Rickettsia* sp. La presencia de *Rickettsia* sp. en los pools (n=195) compuesto por órganos y contenido estomacal macerado de las garrapatas a repleción, fue determinada mediante PCR empleando los iniciadores RpCS.877p y RpCS.1258n, los cuales amplificaron satisfactoriamente el gen de la citrato sintasa (*gltA*) en un rango de 380-397 pb (Fig. 2). La purificación y la secuenciación de los productos positivos fueron realizados por Macrogen (USA) en dos sentidos (Forward, Reverse); los productos secuenciados mostraron una conformación de 364 pb., al analizarse arrojaron una identidad del 100% a *Rickettsia rickettsii* con la cepa Brasileña 647 (No. de acceso KJ588069.1) y 99% de similitud a las cepas del InDRE (KU587806.1 y KT881097.1) depositados en la base de datos del GenBank.

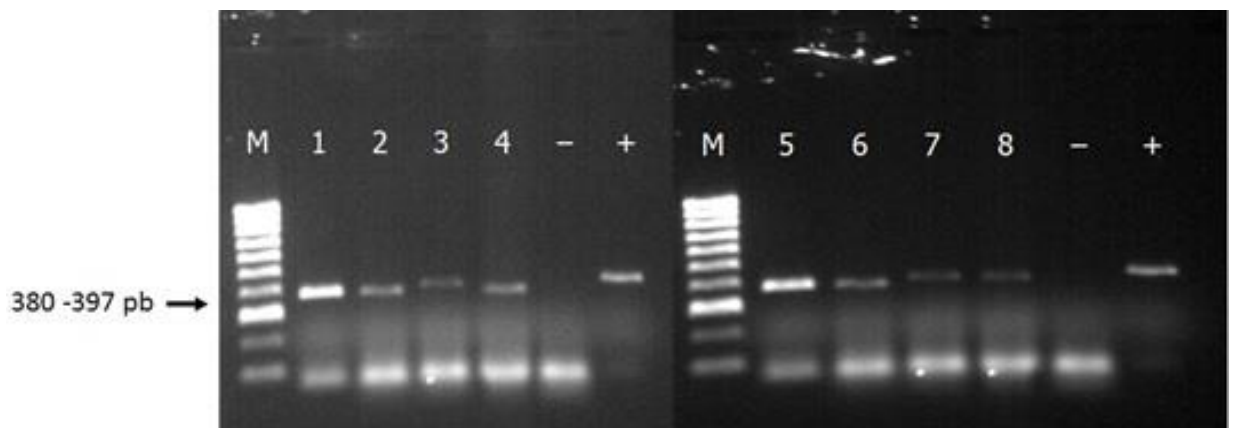


Figura 3. Productos de PCR con el gen *gltA* de *Rickettsia* sp., obtenido del ADN de pools de garrapatas *R. sanguineus*. Carriles: 1-2= Granada, 3= Vizcaya, 4= Consuelo, 5= Alamito, 6= Parras de la Fuente, 7-8= Leticia Herrera. M=

marcador molecular 100-1000 pb., + = Control positivo, - = Control negativo sin ADN. Fragmento observado de 380-397 pb.

De los pools analizados, se encontró a la bacteria *Rickettsia rickettsii* manifestando frecuencias altas del 7.1% (2/28) en el ejido Granada (Matamoros, Coahuila) y 6.9% (2/29) en la colonia Leticia Herrera (Gómez Palacio, Durango). Las otras cuatro áreas muestreadas obtuvieron menor frecuencia, donde destacan tres localidades del municipio de Matamoros, Coahuila: ejido Vizcaya (1/19=5.25%), Alamito (1/23=4.35%) y ejido Consuelo (1/32= 3.13%); así como un pool positivo (1/26= 3.85%) para el municipio de Parras, Coahuila (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

El medio rural y semiurbano presenta desplazamientos de humanos, perros y otros animales domésticos del campo al poblado; favoreciendo el transporte de garrapatas del área silvestre al hogar, donde conviven en aglomeración con otros animales domésticos, tal como lo manifiesta Bustamante (1956, 1964). Las características anteriormente descritas propician la reemergencia de rickettsiosis, cuando las condiciones ambientales de humedad y temperatura son favorables para que el vector aumente sus poblaciones y el patógeno se manifieste.

En las áreas rurales que comprenden los municipios de Matamoros (Coahuila) y Gómez Palacio (Durango), México; se encuentran cohabitando las garrapatas *R. sanguineus*, *Otobius megnini* (Dugès, 1884) y *Argas persicus* (Oken, 1818), donde la garrapata café del perro (*R. sanguineus*) es la especie más abundante y frecuente en perros domésticos y de vida libre (Hoffmann 1962, Castillo-Martínez et al. 2015; 2016). Existen otras especies de ixódidos (*Dermacentor* sp., *Amblyoma* sp.) que pudieran estar implicados en la transmisión de *R. rickettsii* (Guzmán-Cornejo et al. 2011; Guzmán-Cornejo et al. 2016), sin embargo, hasta el momento solo *R. sanguineus* se ha involucrada en el ciclo de transmisión rickettsial en la Comarca Lagunera (Bustamante & Varela 1947, Labruna et al. 2011); donde se han presentado múltiples casos de Fiebre Manchada en humanos (SINAVE 2015). Los resultados de este estudio confirman la presencia de *Rickettsia rickettsii* como causante de Fiebre Manchada atribuido a la garrapata *R. sanguineus* como vector

de la bacteria *R. rickettsii*, por ser la especie de garrapata más ampliamente distribuida en la región. Lo anterior concuerda en parte con las investigaciones realizadas por Bustamante et al. (1946), quienes mediante serología aislaron la cepa Bitter Root Valley de rickettsia en garrapatas *R. sanguineus* colectadas en el Ejido Granada; sin embargo, en esta investigación los resultados arrojaron una similitud del 100% a la cepa Brasileña 647 (No. de acceso KJ588069.1) y 99% de similitud a las cepas del InDRE (1098: KU587806.1 y 1075: KT881097.1), puesto que presenta una mutación producto de la transición de una Citosina (GAGCAGG-C-CC) en la posición 338 de la muestra secuenciada en comparación a la Timina (GAGCAGG-T-CC) observada en las cepas (1098, 1075) del InDRE.

Las acciones realizadas al método de obtención del pool y a la extracción de ADN redujeron considerablemente la cantidad de sustancias inhibitoras de la PCR. La extracción y maceración de los órganos internos mostró los mismos resultados que la trituración completa de ejemplares, pero evitando la presencia de material quitinoso en las muestras, lo cual interfiere en la centrifugación y precipitación de sólidos. Las modificaciones al protocolo del CTAB sustituyeron algunos procedimientos para acortar la metodología, se modificaron los tiempos de centrifugado y las temperaturas para la precipitación del ADN; obteniendo los mismos resultados que la técnica original de Doyle & Doyle (1987). Al someter el ADN extraído bajo ensayos de PCR, se obtuvieron ocho muestras positivas al género *Rickettsia* sp. utilizando los iniciadores genéricos diseñados por Regnery et al. (1991). Los resultados positivos secuenciados (8/195= 4.1%) concuerdan con las investigaciones realizadas por Demma et al. (2005), quienes mencionan que solo del 1 al 5% de las garrapatas están infectados por rickettsias en zonas de baja incidencia a Fiebre Manchada; sin embargo, las frecuencias son relativamente altas en cada localidad con presencia de *R. rickettsii* de acuerdo a los pools analizados.

CONCLUSIÓN

La bacteria *R. rickettsii* está presente en áreas rurales y periurbanas de la Comarca Lagunera de Coahuila y Durango y su principal vector hasta el momento es la garrapata café del perro *R.*

sanguineus. El comportamiento de los casos humanos positivos a Fiebre Manchada, indican que la bacteria *R. rickettsii* se encuentra en los órganos internos de la garrapata y se comporta como un patógeno reemergente. Los movimientos del medio rural al urbano y las actividades que involucran el pastoreo de ganado, propician la diseminación de garrapatas y patógenos que causan enfermedades de interés en salud pública y veterinaria; por lo tanto se recomienda realizar más investigaciones para conocer la diversidad de ixódidos y patógenos presentes en los estados de Coahuila y Durango.

LITERATURA REVISADA

Bustamante, M. 1956. Aspectos epidemiológicos de las Rickettsias en México: 1934 a 1954.

Gaceta Médica de México, 3:207-216.

Bustamante, M. E., Varela, G. & Ortiz-Mariotte, C. 1946. Estudios de Fiebre Manchada en

México. Fiebre Manchada en la Laguna. *Revista Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 7: 39- 48.

Bustamante, M.E. 1964. Symposium sobre histoplasmosis pulmonar primaria II: Epidemiología.

Gaceta Médica de México, 5: 509-518.

Bustamante, M.E. y Varela, G. 1947. Estudios de Fiebre Manchada en México: papel del

Rhipicephalus sanguineus en la transmisión de la Fiebre Manchada en la República Mexicana. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 8:139-41.

Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S., Méndez-López, R., Pérez-Muñoz, R., Hernández-

Rodríguez, S. y Ortega-Morales, A. 2016. Garrapatas (Acari: Ixodidae, Argasidae) de la Comarca Lagunera en Durango, México. *Entomología Mexicana*, 3: 26–32.

Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S.M., Hernández-Rodríguez, S., Valdés-Perezgasga, M.T.,

Ortega-Morales, A.I. 2015. Garrapatas peridomésticas (Acari: Ixodidae, Argasidae) de Matamoros, Coahuila, México. *Entomología Mexicana*, 2: 47-51.

Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S.M., Hernández-Rodríguez, S., Gallegos-Robles, M.A.,

Valdés-Perezgasga, M.T., Sánchez-Ramos, F.J. y Ortega-Morales, A.I. 2015. Detección

- de *Rickettsia* sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 31 (1): 80-83.
- Covarrubias, C.J., Zavala, V. J. y Vásquez A.J. 2007. Frecuencia de anticuerpos rickettsiales de Fiebre Manchada en pacientes febriles de los municipios San Pedro de las Colonias y Francisco I. Madero, Coahuila, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 6:9-16.
- De Lara, H. J. & Cárdenas, B. R. 2008. Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en pediatría. Revisión clínica de una serie de 115 casos. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*, 22: 4-9.
- Demma, L. J., M. S. Traeger, W. L. Nicholson, C. D. Paddock, D. M. Blau, M. E. Ereemeeva, G. A. Dasch, M. L. Levin, J. Singleton, S. R. Zaki, J. E. Cheek, D. L. Swerdlow & J. H. McQuiston. 2005. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *New England Journal of Medicine*, 353(6): 587-594.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Guzmán-Cornejo C., R.G. Robbins, A.A. Guglielmone, G. Montiel-Parra & T.M Pérez. 2011. The *Amblyomma* (Acari: Ixodida: Ixodidae) of Mexico: identification keys, distribution and hosts. *Zootaxa*, 2998: 16–38.
- Guzmán-Cornejo, C., R.G. Robbins, A.A. Guglielmone, G. Montiel-Parra, G. Rivas & Pérez T.M. 2016. The *Dermacentor* (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. *Zookeys*, 24 (569):1-22.
- Hoffman, A. 1962. Monografía de los Ixodoidea de Mexico: parte I. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 23: 191 pp
- Hunter, W. D. & Hooker W A. 1907. Information concerning the North American Fever Tick, with notes on other species. *U.S. Dept. Agric. Bureau of Entomology Bulletin*. No. 72: 87 pp.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2016. Mapa Digital de México. [En línea]

<http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/?v=bGF0OjI1LjU0ODk5LGxvbjotMTAzLjQwMTkyLHo6OCxsOmMxMTFzZXJ2aWNpb3N8dGMxMTFzZXJ2aWNpb3M=> [Fecha de consulta 13/Junio/2016].

Labruna, M. M. Ogrzewalska, J. Soares, T. Martins, H. Soares, J. Moraes-Filho, F. Nieri-Bastos, A. Almeida, & A. Pinter. 2011. Experimental Infection of Ticks with *R. rickettsii*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5): 829-834.

Macías-Valadez, S. 1923. Ensayo de una monografía sobre Ixodidos mexicanos vulgo garrapatas. *Memorias de la Sociedad Científica Antonio Alzate*, 41: 197-216.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2016. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. [En línea] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome [Fecha de consulta 28/Mayo/2016].

Ortíz-Mariotte, C. 1945. Estudio de la Ffiebre Mmanchada en la zona de Jimulco. *Boletín Epidemiológico*, 8: 26–28.

Regnery, R. L., Spruill, C. L. & Plikatys, B. D. 1991. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraespecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal Bacteriology*, 173: 1576-1589.

Silva-Goytia, R. y Elizondo A. 1952. Estudios sobre Ffiebre Mmanchada en México. II. Parásitos hematófagos encontrados naturalmente infectados. *Revista Mexicana de Medicina*, 32 (654): 278-282.

Silva-Goytia, R. y Elizondo A. 1953. Estudios sobre Ffiebre Mmanchada en México. III. Estudios por medio de fijación de complemento de sueros de ciertos animales domésticos de la Comarca Lagunera. *Revista Mexicana de Medicina*, 33 (670): 76-83.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2015. Anuarios de Morbilidad: Fiebre Manchada. [En línea] http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/enfermedad/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_fuente_notificacion. [Fecha de

consulta 19/ julio/ 2016].

Varela, G. y Aparicio, A. 1951. Intestinal bacteria found in *Triatoma* and *Ornithodoros*. *The American Journal of Tropical Medicine*, 31 (3): 381-382.

Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G. & P.M. Preston., P.M. 2014. *Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species*. Bioscience Reports, Edinburgh Scotland, U.K. 221 p.H

Wood, D. O., L. R. Williamson, H. H. Winkler & D. C. Krause. 1987. Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene. *Journal of Bacteriology*, 169: 3564-3572.

CONCLUSIÓN GENERAL

La bacteria *R. rickettsii* está presente en áreas rurales y periurbanas de la Comarca Lagunera de Coahuila y Durango y su principal vector hasta el momento es la garrapata café del perro *R. sanguineus*. El comportamiento de los casos humanos positivos a Fiebre Manchada, indican que la bacteria *R. rickettsii* se encuentra en los órganos internos de la garrapata y se comporta como un patógeno reemergente. Los movimientos del medio rural al urbano y las actividades que involucran el pastoreo de ganado, propician la diseminación de garrapatas y patógenos que causan enfermedades de interés en salud pública y veterinaria; por lo tanto se recomienda realizar más investigaciones para conocer la diversidad de ixódidos y patógenos presentes en los estados de Coahuila y Durango.