



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Rickettsias asociadas con argásidos
(Ixodida: Argasidae) de cuevas en México.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Yecenia Martínez Nájera

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo

2016

Ciudad Universitaria, CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Martínez
Nájera
Yecenia
58323572
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308258527
2. Datos del tutor
Dra.
María del Carmen
Guzmán
Cornejo
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Miriam del Socorro
Berzunza
Cruz
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Ricardo
Paredes
León
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Juan Luis
Chávez
Pacheco
6. Datos del sinodal 4
Biól.
Daniel Sokani
Sánchez
Montes
7. Datos del trabajo escrito
Rickettsias asociadas con argásidos (Ixodida: Argasidae) de cuevas en México.
70 p
2016

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas de su casa, y a la Facultad de Ciencias por su espacio, profesores y aprendizaje.

Al proyecto PAPIIT-DGAPA (IN214114) “Inventario de argásidos (Ixodida: Argasidae) en cuevas de México. Huéspedes, distribución y relaciones filogenéticas”, por la beca otorgada para la conclusión de mis estudios y por ende el conocimiento que se adquirió en este gran proyecto.

Agradezco enormemente a mi tutora de tesis, la Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este proyecto, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y enseñarme que siempre hay que luchar por lo que se quiere, es una gran persona tanto en el ámbito profesional como personal, muchísimas gracias.

A mis sinodales por aceptar ser parte de mi jurado, por su tiempo para la revisión de este trabajo, por sus revisiones y comentarios: al Biól. Sokani Sánchez Montes a quien de verdad jamás dejaré de agradecer el que me haya enseñado y ayudado en la realización de los análisis moleculares, además de formar parte del jurado, se convirtió en un amigo y gran profesor al enseñarme cosas que no sabía sobre este tema, a la Dra. Miriam Berzunza Cruz por su apoyo absoluto y enseñanzas no solo en la realización de la tesis sino durante mi servicio social, además por confiar en mí para seguir colaborando en el equipo de trabajo, al Dr. Ricardo Paredes León por las aportaciones a este trabajo, y al Dr. Juan Luis Chávez Pacheco por ser parte de la revisión y además ser un excelente profesor.

A la Dr. Dorothea Ingeborg Becker Fauser, quien me permitió realizar los análisis moleculares que se presentan en este trabajo y el servicio social en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, además por permitirme aprender y seguir aprendiendo con su equipo de trabajo.

A el M. en C. Pablo Colunga que me apoyo y compartió sus conocimientos, además alegrarme con esa picardía tan peculiar, a la M. en C. Cristina Cañeda por ser tan buena profesora y motivarme a terminar la tesis, a la Dra. Edith quien me brindo todo su apoyo y me alentaba a terminar este proyecto, al Dr. César Ríos quien es un excelente profesor, me apoyo para terminar este proyecto y seguir con mucho más, lo consideró un amigo, a la Biól. Deborah Espinosa por decirme que yo podía, muchas gracias.

A la M. en C. Laura Valdemar del Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud, del Instituto de Biología, UNAM, por su colaboración en la obtención de las secuencias para este trabajo.

A la Dra. Livia Socorro León Paniagua y su equipo de trabajo de la Colección de Mamíferos del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, por la ayuda en la recolecta, procesamiento e identificación de los murciélagos, huéspedes de argásidos.

A la Biól. Laura del Castillo Martínez por la ayuda en la recolecta y el montaje de los ejemplares, además de su enteró apoyo para terminar este trabajo.

A la M. en C. Griselda Montiel Parra por la ayuda en las recolectas de los ejemplares durante las salidas de campo.

A todas las personas que colaboraron con el proyecto ARGAMA; Andrea Rebollo por tu apoyo en el laboratorio y compañía, Ali Zeltzin Lira por compartir charlas y experiencias de las prácticas, además de convivir como compañeras y amigas, Martín Cabrera, Josué López y otros.

Muchas gracias.

Agradecimientos personales

A mis padres Magabeli Nájera Quezada y Saúl Martínez Guevara, quienes me han enseñado desde pequeña a valorar todo lo que tengo y luchar por lo que quiero, gracias por ser tan buenos padres y guiarme hasta este momento, los quiero y agradezco el mejor regalo que me pudieron dar “mi estudio” y aprender a seguir adelante.

A mis hermanos: Verónica quien a pesar de los obstáculos a lo largo de la carrera supo seguir adelante, eres un ejemplo de que si se pueden realizar las cosas, a Saúl por siempre alentarnos a ser mejores y que lo que más quiere es que nos superemos, al igual tú pronto lo lograras, a Miguel por ser tan solidario, apoyarme y darme la más grande alegría aunque adelantada, a José por ser tan tú (peculiar) siempre demostrándome tu cariño, eres tan inteligente que sé que lograras lo que te propongas, y a Laura que me alegras siempre por compartir no solo cosas de hermana, sabes que agradezco que existas eres como una hija, la cual me motivo siempre al decirme que conmigo si aprendía cosas que le eran difíciles, a todos los quiero y agradezco que estén conmigo.

A mi sobrino Gael que es la inspiración y motivación más grande que tenía para terminar esté proyecto, te adoro.

A mi cuñada Kayra y mi tía Gloria Nájera, quienes me apoyaron y me decían que yo podía hacer las cosas, a mis tíos Edith y Alfonso Nájera por apoyarme en mis estudios, a Antonieta una persona que admire y quise como una abuela.

A la Biól. Angeles Ibarra, gracias por ser mi amiga y confidente, sabes que te aprecio demasiado y así me has apoyado demasiado en todo momento, para terminar la tesis y seguir echándole ganas, también en toda la carrera desde primer semestre.

A la Biól. Gabriela Morales, gracias por apoyarme en la tesis y compartir tus conocimientos conmigo y en otros cursos adicionales, eres una gran amiga, fuiste mi amiga desde el inicio de está carrera y sigues aquí, gracias te quiero.

A Karen Itzel Rivera, gracias por tu apoyo en todo momento tanto en la tesis, las materias (toda la carrera) y en lo personal, te quiero muchísimo amiga.

A Víctor Hugo Morales por ser parte importante de mi vida, agradezco enormemente que estés a mi lado, eres alguien muy especial y un gran amigo, gracias por preocuparte por mí, por esperarme, apoyarme en todo momento en serio que lo hiciste desde el inicio, por enseñarme tantas cosas tan padres de la carrera, compartir conmigo tus conocimientos, y más por presionar para que ya me titule, te quiero.

A Erika Bautista quien no solo consideró una amiga ya eres parte de mi familia, gracias porque me has brindado un gran apoyo siempre que lo necesito, durante la carrera y realización de la tesis siempre has estado aquí, gracias cuñis-hermana te quiero harto (recuerdas fuiste la primera que conocí en la facultad).

A Daniel Pérez agradezco desde el principio que me hayas alentado a terminar este proyecto y seguir con las metas que tengo en la vida, gracias por ser la persona que eres y un amigo, por ayudarme y apoyarme en todo respecto a mis estudios y en lo personal siempre has estado ahí.

A mis amigos de la preparatoria que son como mi familia: David Hdz., Jonathan Gtz., Monserrat Mtz., Roberto Mtz., Jair A., David R., Carla L., Jess, Salvador y Carlos.

A todos mis amigos porque cada uno me motivo a seguir adelante con esté proyecto y en lo personal: Abraham, Liliana, Sandra, Yeimi, Daniel, Cristina, Jorge, Fabian, Armando, Miguel (Dante), Brandon, Verónica, Daniela, Sokani, Pablo, Yokomi, Monserrat, Marian, Ricardo, Eloy, Néstor, Angel, Rodolfo, Nayeli, Edmundo, Ali, Fanny, Luisa, Jaqueline, Surizaday y Gregory.

A todas las personas que me apoyaron muchas gracias.

Índice general

Resumen	9
I. Introducción	10
Familia Ixodidae.....	11
Familia Nuttalliellidae.....	12
Familia Argasidae	12
Garrapatas como vectores	13
Rickettsias	14
II. Antecedentes	16
III. Biología de los huéspedes estudiados	19
Familia Emballonuridae Gervais, 1856.....	19
<i>Balantiopteryx io</i> Thomas, 1904.....	19
Familia Phyllostomidae Gray, 1825.....	20
<i>Desmodus rotundus</i> (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1810).....	20
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	21
<i>Mimon cozumelae</i> Goldman, 1914	22
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766).....	22
<i>Artibeus jamaicensis</i> Leach, 1821	23
<i>Carollia sowelli</i> Baker, Solari y Hoffmann, 2002	24
IV. Objetivos	25
General	25
Particulares	25
V. Área de estudio	26
Chiapas.....	26
Quintana Roo.....	26
Tabasco.....	27
Yucatán.....	27
VI. Material y Métodos	30
Trabajo de campo	30
Trabajo de laboratorio	31

VII. Resultados	34
Estudio Morfológico	36
Estudio Molecular	40
Análisis ecológico	46
VIII. Discusión	47
IX. Conclusiones	51
X. Bibliografía	53

Índice de cuadros

Cuadro 1. Especies de rickettsias registradas asociadas con garrapatas y casos clínicos en México.....	18
Cuadro 2. Registro de garrapatas y murciélagos recolectados en ocho cuevas del sur de México.....	35
Cuadro 3. Ejemplares de garrapatas analizados con el fragmento de 381 pb del gen <i>gltA</i> para la detección de rickettsias.	40
Cuadro 4. Ejemplares analizados para la detección de rickettsias con los fragmentos de 806 pb y 532 pb de los genes <i>gltA</i> y <i>ompA</i>	41
Cuadro 5. Porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas en el presente trabajo y las secuencias de GenBank.	42
Cuadro 6. Prevalencia de las especies de rickettsias en relación con las especies de garrapatas.....	46

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de rickettsias (tomado y modificado de Elfving, 2013).....	15
Figura 2. A. <i>Balantiopteryx io</i> (tomado de Papiit IN214114, 2014); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015). ...	20
Figura 3. A. <i>Desmodus rotundus</i> (tomado de Global Biodiversity Information Facility, 2015); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).....	21
Figura 4. A. <i>Diphylloca ecaudata</i> (tomado de Flickr, 2015); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).	21

Figura 5. A. <i>Mimon cozumelae</i> (tomado de Ceballos y Oliva, 2005); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).....	22
Figura 6. A. <i>Glossophaga soricina</i> (tomado de Ceballos y Oliva, 2005); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).....	23
Figura 7. A. <i>Artibeus jamaicensis</i> (tomado de Ceballos y Oliva, 2005); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).....	24
Figura 8. A. <i>Carollia sowelli</i> (tomado de Flickr, 2015); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).	24
Figura 9. Ubicación geográfica de las cuevas visitadas en este estudio.....	29
Figura 10. Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor-Joining utilizando el fragmento de 806 pb del gen <i>gltA</i> donde se muestran las relaciones génicas entre las secuencias de <i>Rickettsia</i> detectadas en las diferentes especies de garrapatas recolectadas y las obtenidas de GenBank.....	44
Figura 11. Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor-Joining utilizando el fragmento de 532 pb del gen <i>ompA</i> donde se muestran las relaciones génicas entre las secuencias de <i>Rickettsia</i> detectadas en las garrapatas recolectadas y las obtenidas de GenBank.	45

Índice de apéndices

Apéndice I. Extracción de DNA.....	64
Apéndice II. Amplificación del DNA	66
Apéndice III. Electroforesis.....	67
Apéndice IV. Secuenciación.....	67
Apéndice V. Especies de referencia utilizadas para los alineamientos	67
Apéndice VI. Análisis de distancias genéticas	69

Resumen

Los ácaros Ixodida (garrapatas) son ectoparásitos hematófagos de diversos grupos de vertebrados terrestres, los cuales se dividen en tres familias: Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae. Tienen importancia médico-veterinaria al ser vectores de diversos patógenos, entre los que se encuentran las rickettsias. Estas bacterias intracelulares gram negativas se dividen en tres grupos: Tifo, Fiebres Manchadas y grupo belli.

En particular el papel de las garrapatas Argasidae como posibles vectores de rickettsias en México ha sido poco estudiado. Por ello el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de especies del género *Rickettsia* en argásidos recolectados en cuevas, mediante la amplificación de los fragmentos de los genes que codifican la citrato sintasa (*gltA*) y la proteína exterior de membrana A (*ompA*).

Los ejemplares recolectados se obtuvieron de ocho cuevas distribuidas en cuatro estados de la República Mexicana (Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán). Las garrapatas fueron identificadas con ayuda de claves taxonómicas; la identificación entre ninfas y adultos fue corroborada mediante la amplificación del gen 16S rDNA.

Para la detección de rickettsias se realizó la amplificación del fragmento de 381 pb del gen *gltA*, adicionalmente todos los ejemplares positivos fueron corroborados mediante la amplificación de los fragmentos de 806 pb del gen *gltA* y de 532 pb del gen *ompA* (este último es específico para la diferenciación del grupo de las Fiebres Manchadas). Los productos positivos de PCR se enviaron secuenciar; las secuencias obtenidas se compararon mediante el algoritmo BLAST, se alinearon con el programa MEGA 6, y analizaron mediante el método de Neighbor-Joining con el fin de generar un dendrograma para identificar la similitud con respecto a especies de *Rickettsia* de referencia (obtenidas a partir de GenBank).

Se detectaron un total de tres taxones (*Rickettsia ca. belli*, *Rickettsia ca. lusitaniae* y *Rickettsia* sp.) asociados con *Ornithodoros brodyi*, *Ornithodoros yumatensis* y *Ornithodoros azteci* respectivamente, en los estados de Chiapas, Quintana Roo y Yucatán.

Este estudio representa el primer trabajo de rickettsias asociadas con argásidos en México; sin embargo, se requieren de nuevas colectas que ayuden al conocimiento sobre rickettsias asociadas con argásidos y su papel como potenciales vectores en nuestro país.

I. Introducción

Los ácaros constituyen un grupo muy diverso de artrópodos, los cuales están incluidos en la clase Arachnida y subclase Acari (Lindquist *et al.*, 2009). Es un taxón conformado por alrededor de 54, 617 especies a nivel mundial y en México se tiene el registro de alrededor de 2, 625 especies (Pérez *et al.*, 2013). La diversidad de los ácaros también se ve reflejada en las relaciones que establecen con otros seres vivos (*e.g.*, animales, plantas y hongos), destacando la foresia, el comensalismo y el parasitismo. En esta última asociación, la interacción (parásito-huésped) se caracteriza por cuatro rasgos de acuerdo con Crofton (1971): 1) el parásito depende fisiológicamente de su huésped, 2) la distribución de la población de parásitos dentro de la población de huéspedes es de tipo sobredisperso o agregado, 3) el parásito puede ser causa potencial de la muerte de sus huéspedes en infecciones o infestaciones masivas, y 4) el potencial reproductivo del parásito es mayor que el del huésped.

Los ácaros son animales de tamaño pequeño que van desde 0.1 mm hasta 3 cm, su cuerpo está conformado por un solo tagma llamado idiosoma en donde se localizan las patas (4 pares en adultos y ninfas, y 3 en larvas), dichos apéndices cuentan con 6 artejos (coxa, trocánter, fémur, genua, tibia y tarso). En la región anterior se encuentra el gnatosoma que incluye a los quelíceros que se han modificado para su alimentación según sea el caso: morder, cortar, raspar, succionar o picar; y los pedipalpos que han sufrido cambios a lo largo de su evolución con funciones prensiles o como estructuras sensoriales (Hoffmann, 1988; Pérez *et al.*, 2013).

La forma del cuerpo es muy variada, presentando sedas, placas, proyecciones o estriaciones; el color varía dependiendo de la especie; algunos carecen de ojos, pero hay otros que presentan ocelos, generalmente son uno o dos pares situados en la superficie dorsal y anterior del cuerpo. Los ácaros respiran por medio de estigmas, que se continúan en tubos muy finos o tráqueas, mientras que algunas especies lo hacen a través de la cutícula; la fecundación es interna y durante su ciclo de vida presentan cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, ninfa y adulto (Hoffmann, 1988; Nicholson *et al.*, 2009).

De acuerdo con Lindquist *et al.* (2009) los ácaros incluyen dos grandes grupos, los Acariformes y los Parasitiformes, este último taxón alberga al orden Ixodida, que incluye a los ácaros conocidos como garrapatas.

Las garrapatas son los ácaros de mayores dimensiones (hasta 3 cm), los cuales son ectoparásitos hematófagos obligados de vertebrados terrestres, como anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Anderson y Magnarelli, 2008; Cortés, 2011). Son parásitos en todos sus estados de desarrollo, pudiendo actuar como vectores de numerosos organismos patógenos, capaces de originar enfermedades y hasta la muerte a sus huéspedes (Sonenshine *et al.*, 2002).

Están provistas de un órgano de fijación característico denominado hipostoma, armado con numerosos dientes que les sirve para asirse sobre el huésped; el tarso I, presenta una estructura llamada órgano de Haller, el cual tiene como función recibir estímulos químicos y térmicos; además de presentar una placa espiracular (para la respiración) que se ubica por detrás del cuarto par de patas. Su distribución es cosmopolita, aunque son más diversas en regiones tropicales y subtropicales, aproximadamente se han descrito 894 especies a nivel mundial y 100 especies para México (Keirans, 2009; Guglielmone *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2013).

El orden Ixodida se divide en tres familias, Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae (Sonenshine *et al.*, 2002).

Familia Ixodidae

Conocidas como garrapatas duras, se caracterizan por presentar un marcado dimorfismo sexual, las hembras, ninfas y larvas tienen un escudo dorsal incompleto, mientras que los machos presentan un escudo completo que cubre todo el idiosoma. Cuando presentan ojos estos aparecen en los márgenes antero-laterales del escudo, frecuentemente presentan festones en el margen del idiosoma y las hembras llevan un par de áreas porosas que son pequeños poros en la base del gnatosoma (Sonenshine *et al.*, 2002; Keirans, 2009; Nava *et al.*, 2009; Guglielmone *et al.*, 2010).

Son generalmente hospedícolas, tienen sólo tres estados postembrionarios (larva, ninfa y adulto), algunas especies presentan un ciclo de vida que incluye tres huéspedes, en el cual cada estado de desarrollo necesita alimentarse de un huésped diferente, permaneciendo días en cada uno de ellos (*e.g.*, *Ixodes ricinus*). También pueden presentar un ciclo de dos

huéspedes, en el cual la larva y ninfa se alimentan de un primer huésped, y los adultos se alimentan de otro (e.g., *Hyalomma dromedarii*). Por último, pocas especies de ixódidos presentan un ciclo con un solo huésped, en el cual pasan todos sus estados de desarrollo (e.g., *Rhipicephalus annulatus*). Las hembras pueden producir entre 500 y 15 000 huevos por puesta de acuerdo con la especie, en ocasiones hasta 22 000 huevos como en el caso de *Amblyomma nuttali*. Esta familia es cosmopolita e incluye 14 géneros y 702 especies a nivel mundial, en México se tiene registro de 68 especies pertenecientes a 5 géneros: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Sonenshine *et al.*, 2002; Keirans, 2009; Nava *et al.*, 2009; Guglielmone *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2013).

Familia Nuttalliellidae

Es un taxón monotípico que incluye a la especie *Nuttalliella namaqua* Bedford 1931, la cual ha sido recolectada sólo en el Sur de África y Tanzania, asociada con diferentes especies de aves y mamíferos: *Suricata suricatta hahni*, *Parotomys brantsi brantsi* e *Hirundo (Cecropis) abyssinica unitatis* (Keirans, 2009). La especie se caracteriza por una mezcla de caracteres compartidos por las otras dos familias de garrapatas; presentan un gnatosoma en posición apical (en vista dorsal) y un pseudoescudo que la asemeja a los ixódidos. El tegumento puede ser de aspecto correoso, mamilado o granuloso, coxas inermes, la estructura del hipostoma y ausencia de áreas porosas como en argásidos. Los caracteres únicos para Nuttalliellidae son la presencia de unos órganos posteriores a las coxas IV de función desconocida, reducción de los pedipalpos con tan sólo tres artejos y la presencia de un “pseudoescudo”. El escudo dorsal, ojos, placas espiraculares, surco genital, áreas porosas en hembras y festones están ausentes (Keirans *et al.*, 1976; Sonenshine, 1991; Keirans, 2009).

Familia Argasidae

Conocidas como garrapatas blandas, se caracterizan por presentar una placa media dorsal en caso de las larvas, mientras que ninfas y adultos carecen de placas dorsales y ventrales en el idiosoma; la cutícula puede ser granulada, plegada, mamilada y/o raramente estriada, presentan coxas sin espolones y ojos que cuando están presentes se encuentran en el margen ventro-lateral o supra-coxal sobre las patas (Keirans, 2009). El ciclo de vida de los argásidos incluye dos patrones, el de múltiples huéspedes, en donde cada uno de los estados

de desarrollo (incluyendo varios estadios ninfales) viven sobre un huésped diferente; y el de un solo huésped (e.g., *Otobius megnini*). Son esencialmente nidícolas, encontrándose en nidos, refugios o madrigueras de aves o pequeños mamíferos (especialmente murciélagos), son considerados como parásitos temporales que se alimentan de su huésped cuando este llega a dormir o descansar usualmente durante minutos u horas. A diferencia de los ixódidos se alimentan de forma intermitente y rápida, y pueden permanecer mucho tiempo sin ingerir alimento; las hembras de esta familia llegan a depositar entre 100 a 500 huevos por puesta (Hoffmann, 1988; Sonenshine *et al.*, 2002; Nava *et al.*, 2009; Guglielmone *et al.*, 2010).

Con base en el esquema de clasificación de Hoogstraal (1985), esta familia incluye 5 géneros: *Antricola*, cuyas especies se asocian con murciélagos y sus sitios de descanso; *Argas* que incluye especies asociadas con aves y reptiles principalmente; *Nothoaspis* asociado con murciélagos; *Ornithodoros* el cual está conformado por especies parásitas de anfibios, reptiles, aves y mamíferos (principalmente murciélagos), y *Otobius* con especies asociadas con mamíferos (Artiodactyla). Esta familia está conformada por 200 especies a nivel mundial y en México sólo 32 especies han sido referidas (Nava *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2013; Sonenshine, 1991; Venzal *et al.*, 2015).

Garrapatas como vectores

Las garrapatas son organismos telmófagos cuyos hábitos las convierten en potenciales vectores, es decir, que son capaces de transmitir un agente infeccioso desde los individuos afectados a otros susceptibles (Anderson y Magnarelli, 2008).

Existen múltiples vías de transmisión de los patógenos: 1) transmisión transestadial, que consiste en que cuando la garrapata se alimenta (en fase larvaria o de ninfa) adquiere al patógeno el cual pasará al siguiente estado de desarrollo, 2) transmisión transovárica, se presenta cuando los huevos en desarrollo se infectan, lo que mantiene al patógeno de forma natural, 3) transmisión por alimentación, cuando una garrapata se alimenta de un huésped infectado pudiendo ser o no susceptible a la infección, o por alimentarse en proximidad con una garrapata previamente infectada, y 4) transmisión por vía sexual, la cual se da entre adultos durante la cópula (Fernández, 2003; Anderson y Magnarelli, 2008; Oliveira *et al.*, 2010).

Las garrapatas han sido referidas como vectores de diversos microorganismos causantes de enfermedades, entre ellos virus (Alphavirus), protozoarios (*Babesia* spp.), hongos (*Dermatophilus congolensis*), nemátodos (*Dipetalonema dracunculoides*) y el grupo que engloba la mayor cantidad de agentes transmisibles: las bacterias (e.g., *Borrelia*, *Ehrlichia* y *Rickettsia*) (Sonenshine, 1991; De la Fuente, 2008; Cortés, 2011).

Rickettsias

Son cocobacilos Gram negativos de crecimiento intracelular obligado. Pertenecen al orden Rickettsiales, subdivisión alfa de la clase Proteobacteria. Se encuentran dentro de la familia *Rickettsiaceae* (en donde también se incluyen los géneros *Anaplasma*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*). Su ciclo de vida se mantiene al infectar diversas especies de huéspedes (en general mamíferos) y vectores (e.g., garrapatas, piojos y pulgas) siendo el hombre un huésped accidental. En este último, causa un conjunto de enfermedades denominadas Rickettsiosis, las cuales son causadas por múltiples especies, entre ellas *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi* y *Rickettsia rickettsii* (Bernabeu *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, las rickettsias patógenas fueron clasificadas dentro de dos grupos: las causantes de Tifo (TG) integrado por *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*, cuyos vectores son piojos del cuerpo (*Pediculus humanus humanus*) y pulgas (*Ctenocephalides* sp. y *Xenopsylla* sp.); el segundo grupo causante de Fiebres Manchadas (SFG), integrado por más de 20 especies transmitidas principalmente por garrapatas (*Amblyomma* sp. y *Rhipicephalus* sp.). Sin embargo, existen algunas especies de rickettsias que han mostrado variaciones antigénicas y genéticas las cuales impiden su inclusión en los grupos antes mencionados, por lo cual se les ha clasificado en un grupo denominado transicional (TRG) o *belli* (Labruna *et al.*, 2011) (Figura 1).

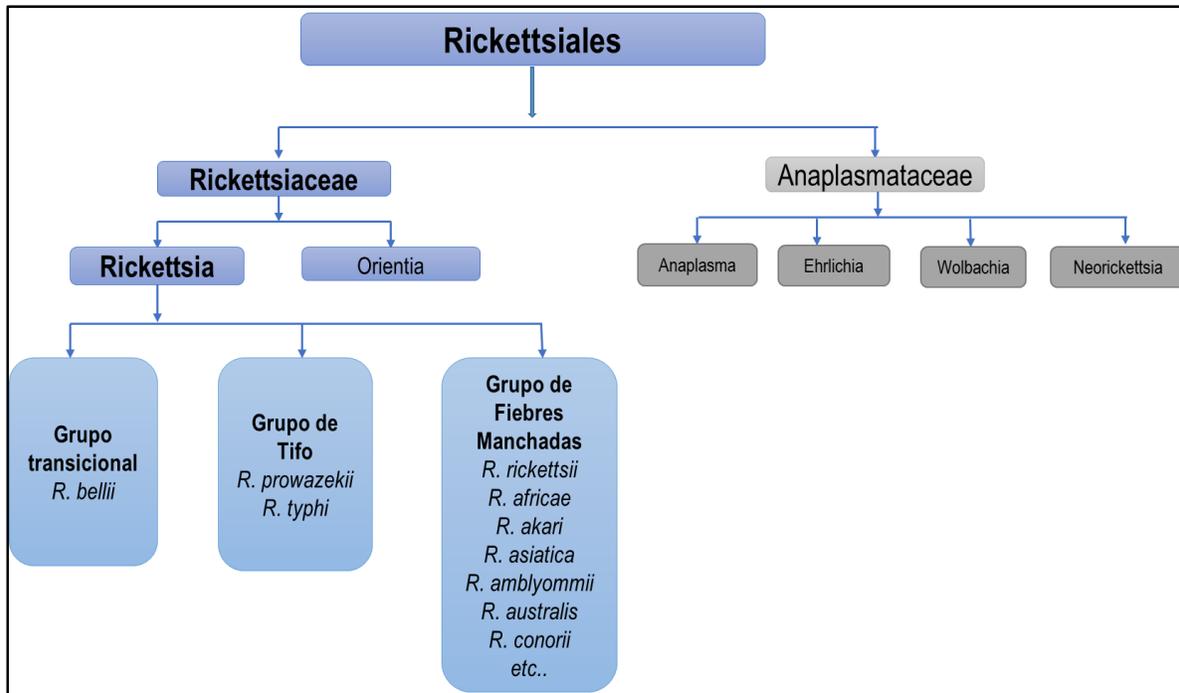


Figura 1. Clasificación de rickettsias (tomado y modificado de Elfving, 2013).

En las últimas décadas se ha incrementado el registro de nuevas especies de rickettsias, desconociéndose en la mayoría de los casos su patogenicidad. Algunas de ellas fueron consideradas no patógenas, pero recientemente se han presentado casos humanos (e.g., *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia monacensis* y *Rickettsia slovacica* en Europa). Además, *Rickettsia parkeri* un viejo miembro del SFG citada por primera vez en 1939; se identificó en un caso humano 65 años después de su aislamiento. Estos hechos demuestran que cualquier nueva rickettsia descrita en huéspedes invertebrados, especialmente garrapatas, deberían ser consideradas potencialmente patógenas para los humanos (Labruna *et al.*, 2011).

Nicholson *et al.* (2009) señalan la necesidad de emprender nuevos estudios de las garrapatas como vectores, ya que el aumento en la movilización de huéspedes y la habilidad de las garrapatas para encontrar nichos en nuevas condiciones climáticas, han resultado en una rápida extensión de distribución y por ende de sus rickettsias asociadas.

II. Antecedentes

En México se han registrado 100 especies de garrapatas pertenecientes a las familias Argasidae e Ixodidae (Pérez *et al.*, 2013). El estudio de garrapatas como vectores de microorganismos en nuestro país estuvo orientado inicialmente a dos tipos de padecimientos, borreliosis y rickettsiosis.

El estudio de rickettsias causantes de enfermedades en la República Mexicana comienza con el trabajo de Hoffmann (1925), quien refiere un padecimiento con el nombre de “Fiebre Manchada de Choix” caracterizado por fiebre petequial y causado por garrapatas de perros identificadas como *Rhipicephalus sanguineus*. Este investigador consideró en un inicio que se trataba de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR); sin embargo, posteriormente la refiere como una “Fiebre Manchada” diferente y aparentemente desconocida. Bustamante y Varela (1943), describen e identifican esta rickettsiosis como FMMR, citándola para los estados de Sinaloa y Sonora; sin embargo, tomando en cuenta la distribución del padecimiento proponen llamarla “Fiebre Manchada Americana”. Posteriormente, Ortiz-Mariotte, Bustamante y Varela (1944) comprueban que *Rhipicephalus sanguineus* es el vector de los microorganismos causantes de esta enfermedad y en 1946 refieren la presencia de este padecimiento en los estados de Coahuila, Durango y San Luis Potosí. Bustamante y Varela (1946) refieren a *Amblyomma mixtum* (= *Amblyomma cajennense*) infectada por esta rickettsia en condiciones naturales en el estado de Veracruz. Para 1947, Bustamante y Varela publican la distribución de las tres rickettsiosis conocidas en México: Tifo murino (*Rickettsia typhi*), Tifo epidémico (*Rickettsia prowazekii*) y Fiebre Manchada, además de aumentar la distribución para las dos primeras en cinco y 13 estados respectivamente. Ese mismo año Bustamante, Varela y Roch describen una nueva rickettsiosis registrada como “Fiebre de Michoacán” y transmitida por *R. sanguineus* con un cuadro clínico muy parecido al causado por la FMMR (Hoffmann, 1962) (Cuadro 1).

Silva-Goytia y Varela (1952) concluyen a través de sus estudios que la Fiebre Manchada Americana es producida por la subespecie *Rickettsia (Dermacentroxenus) rickettsi rickettsi*, además de registrar en los estados de Coahuila y Durango a *Ornithodoros nicolleti* (dentro de casas), *Otobius lagophilus* (parasitando burros) y *R. sanguineus* (en perros) infectadas por esta rickettsia.

Los trabajos publicados sobre rickettsiosis en México fueron recopilados por Labruna *et al* (2011); con esta información la distribución de *R. rickettsii* se amplía a cuatro estados (Baja California, Jalisco, Nuevo León y Yucatán), registrando estos autores como un nuevo vector a la especie *Amblyomma imitator* (Oliveira *et al.*, 2010; Dzul-Rosado *et al.*, 2013); asimismo, se citan nuevos casos de FMMR para los estados de Jalisco y Yucatán. Por otro lado, *R. typhi* y *R. prowazekii* son referidas nuevamente para el país con casos clínicos (Medina-Sánchez *et al.*, 2005; Mercado *et al.*, 2006; SNVE, 2010). Además de que *R. prowazekii* es citada por primera vez en asociación con una garrapata del género *Amblyomma* (Cuadro 1).

Entre las últimas rickettsiosis registradas en México destacan la Rickettsiosis Postulosa asociada con *Rickettsia akari*, y la Fiebre Manchada causada por *Rickettsia felis*, cuyos vectores incluyen a las especies *R. sanguineus* y *Ctenocephalides felis* respectivamente (Cuadro 1).

Con base en lo anterior los estudios sobre rickettsias asociadas con garrapatas en nuestro país son escasos, habiéndose llevado a cabo muchos de ellos durante la primera mitad del siglo XX, específicamente con ixódidos (Ixodidae), existiendo posteriormente poca información, la cual se ha limitado principalmente a casos clínicos y en donde se ha dado poca atención al estudio de vectores y reservorios. Por tal motivo en el presente trabajo se pretende analizar ácaros de la familia Argasidae asociados con murciélagos con el fin de determinar la presencia de rickettsias y aumentar el conocimiento que se tiene sobre este tema en general y en particular en nuestro país.

Cuadro 1. Especies de rickettsias registradas asociadas con garrapatas y casos clínicos en México.

Especie de <i>Rickettsia</i>	Huésped	Distribución geográfica	Enfermedad	Referencias
<i>Rickettsia akari</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Yucatán	Rickettsiosis Postulosa	Zavala-Castro <i>et al.</i> , 2009.
	Casos clínicos	✓	✓	Zavala-Velázquez <i>et al.</i> , 1996,1999.
<i>Rickettsia felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Yucatán	Fiebre manchada	Zavala-Velázquez <i>et al.</i> , 2002, 2006; Panti-May <i>et al.</i> , 2014; Peniche-Lara <i>et al.</i> , 2015
<i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>Amblyomma</i> sp.	Nuevo León	Tifo epidémico	Medina-Sánchez <i>et al.</i> , 2005; Cortes-González <i>et al.</i> , 2008.
	Casos clínicos	Estado de México	✓	Bustamante y Varela, 1947; Alcántara <i>et al.</i> , 2004.
	✓	Hidalgo	✓	Bustamante y Varela, 1947.
	✓	Oaxaca	✓	✓
	✓	Puebla	✓	✓
	✓	Veracruz	✓	✓
	✓	Jalisco	✓	Mercado <i>et al.</i> , 2006.
	✓	Chiapas	✓	SNVE, 2010.
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Sinaloa	Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR)	Bustamante y Varela, 1943
	✓	Sonora	✓	Mariotte y Bustamante, 1944; Martínez-Medina <i>et al.</i> , 2005, 2007; Álvarez-Hernández, 2010.
	✓	Durango	✓	Bustamante y Varela, 1947
	✓	San Luis Potosí	✓	Bustamante y Varela, 1947; Zarate-Aquino, 1992.
	✓	Coahuila	✓	Zarate-Aquino, 1992.
	✓	Baja California	✓	SNEV, 2010; Eremeeva <i>et al.</i> , 2011; Field-Cortazares <i>et al.</i> 2015
	<i>Ornithodoros nicollei</i>	Coahuila y Durango	✓	Silva-Goytia y Elizondo, 1952.
	<i>Otobius lagophilus</i>			
	<i>Amblyomma mixtum</i>	Veracruz	✓	Bustamante y Varela, 1946.
	<i>Amblyomma imitator</i>	Nuevo León	✓	Oliveira <i>et al.</i> , 2010.
	<i>Amblyomma parvum</i>	Yucatán	✓	Dzul-Rosado <i>et al.</i> 2013
	Casos clínicos			Zavala-Castro <i>et al.</i> , 1996,2006,2008
	✓	Guadalajara	✓	Martin del Campo <i>et al.</i> , 2010.
<i>Rickettsia typhi</i>	Casos clínicos	Ciudad de México	Tifo murino o endémico	Bustamante y Varela, 1947.
	✓	Guerrero	✓	✓
	✓	Hidalgo	✓	✓
	✓	Jalisco	✓	✓
	✓	Estado de México	✓	✓
	✓	Michoacán	✓	✓
	✓	Nayarit	✓	✓
	✓	Nuevo León	✓	✓
	✓	Oaxaca	✓	✓
	✓	Puebla	✓	✓
	✓	Querétaro	✓	✓
	✓	Tamaulipas	✓	✓
	✓	Zacatecas	✓	✓
	✓	Yucatán	✓	Zavala-Castro <i>et al.</i> 2009, 2014. Peniche-Lara <i>et al.</i> 2015.

III. Biología de los huéspedes estudiados

Los murciélagos son el segundo orden más diverso de mamíferos (Orden Chiroptera), se caracterizan por su capacidad de vuelo y hábitos nocturnos. Existen alrededor de 1,116 especies agrupadas en 17 familias. Se distribuyen prácticamente en todo el mundo, con excepción de las regiones más frías como lo polos y las cumbres de las montañas más elevadas. En México habitan 139 especies representadas por ocho familias (Emballonuridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae y Vespertilionidae), cinco de las cuales son endémicas de América (Ceballos y Oliva, 2005).

Familia Emballonuridae Gervais, 1856

Esta familia se encuentra representada por 13 géneros y 47 especies, tienen una amplia distribución en las zonas tropicales de África, América, Asia y Australia. En México está conformada por nueve especies y seis géneros: *Balantiopteryx*, *Centronycteris*, *Diclidurus*, *Peropteryx*, *Rhynchomycteris* y *Saccopteryx* (Ceballos y Oliva, 2005).

***Balantiopteryx io* Thomas, 1904**

Murciélago pequeño, cuyo pelaje es oscuro en la región dorsal y más pálido ventralmente. El uropatagio está cubierto de pelo hasta donde empieza la cola y esta sobresale a la mitad de la superficie dorsal (Ceballos y Oliva, 2005). Se distribuye desde la vertiente del Atlántico hasta el sur de México, Belice y Guatemala (Lim *et al.*, 2008). En México se ha registrado en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 2).

Habita en bosques semidecíduos o de hoja perenne desde el nivel del mar hasta 1,500 msnm, se reúnen en grupos conformados por 50 o más individuos, los cuales se refugian en cuevas de piedra caliza, grietas y techos, y se alimentan de pequeños insectos (Ceballos y Oliva, 2005; Lim *et al.*, 2008).

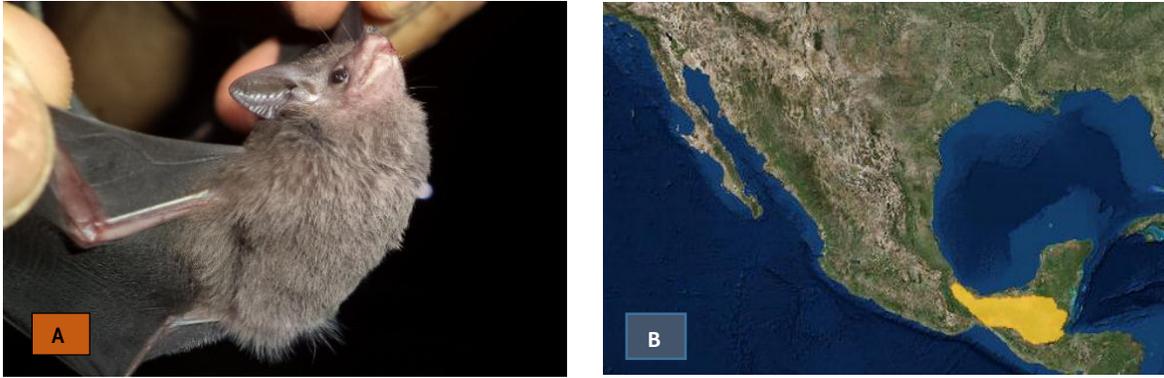


Figura 2. A. *Balantiopteryx io* (tomado de Papiit IN214114, 2014); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

Familia Phyllostomidae Gray, 1825

Esta familia endémica de las regiones tropicales del continente americano, está conformada por aproximadamente 49 géneros y 143 especies. En México se encuentran 55 especies de 32 géneros.

***Desmodus rotundus* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1810)**

Conocidos como murciélagos vampiros, son de tamaño mediano, pelaje denso y corto con una coloración dorsal grisácea oscura. Las orejas son pequeñas, puntiagudas y separadas. El uropatagio con pelos cortos y escasos, carece de cola (Ceballos y Oliva, 2005). Se distribuye desde el Norte de México hasta Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y Venezuela; se ha reportado hasta 2300 msnm (Barquez *et al.*, 2008). En México se ha registrado en los estados de Campeche, Chihuahua, Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, México, Nuevo León, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán, y Zacatecas (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 3).

Habita en climas cálidos, son hematófagos que transmiten el virus de la rabia por lo cual genera grandes pérdidas económicas en el ganado. Se encuentran en grandes colonias que van de 20 a 100 individuos, aunque se han reportado grupos de 500 hasta 5,000. Habitan en cuevas que son moderadamente iluminadas con fisuras profundas, y en huecos de árboles (Barquez *et al.*, 2008).



Figura 3. A. *Desmodus rotundus* (tomado de Global Biodiversity Information Facility, 2015); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

***Diphylla ecaudata* Spix, 1823**

Es un murciélago de tamaño mediano, se distingue por tener orejas cortas y redondas, con ojos muy grandes. Las patas tienen abundante pelo que llega hasta la base de las uñas, los ojos son grandes y redondos. El color del pelo es moreno con la base clara, es largo y sedoso (Ceballos y Oliva, 2005). Se distribuyen en el continente Americano, extendiéndose desde el sur de México, Bolivia, Brasil, Perú hasta Venezuela. En México se ha registrado en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 4).

Habita en tierras tropicales y subtropicales, en bosques. Se alimenta principalmente de sangre de aves. Se refugia en cuevas y minas abandonadas encontrándose solos o en grupos pequeños aproximadamente de 12 o menos individuos (Ceballos y Oliva, 2005).



Figura 4. A. *Diphylla ecaudata* (tomado de Flickr, 2015); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

***Mimon cozumelae* Goldman, 1914**

Es un murciélago de tamaño mediano, presenta una hoja nasal grande y sin pelos. El color del pelaje es café oscuro, en la espalda es largo y el del vientre es corto, con cola larga y presenta un cráneo corto (Ceballos y Oliva, 2005). Se distribuye en Belice, Colombia, Costa Rica, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá. En México se le ha registrado en los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 5).

Habita en bosque semideciduo y bosque de hoja perenne madura, en grupos de 2 a 20 individuos refugiándose en cuevas de piedra caliza y troncos huecos; se alimenta de escarabajos, saltamontes, aves y lagartos (Arroyo *et al.*, 2008).

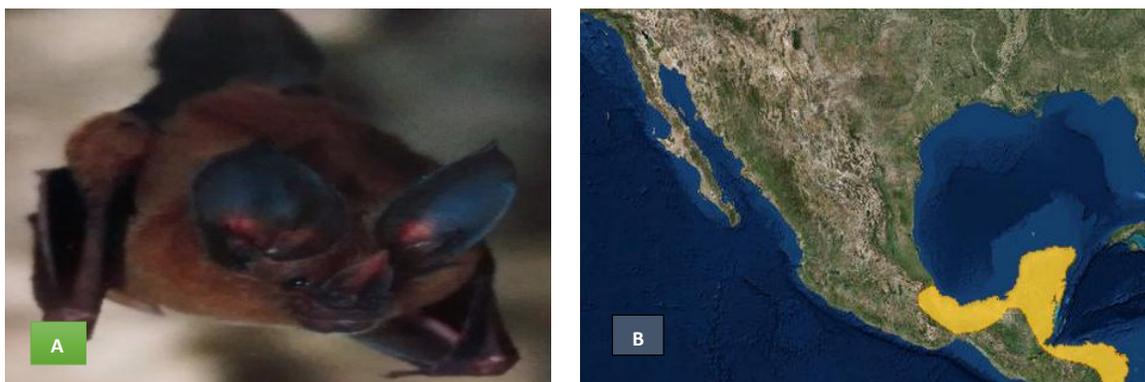


Figura 5. A. *Mimon cozumelae* (tomado de Ceballos y Oliva, 2005); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

***Glossophaga soricina* (Pallas, 1766)**

Es un murciélago de tamaño medio, presentan un hocico alargado provisto de una hoja nasal. Presenta orejas pequeñas y redondeadas, alas relativamente pequeñas y el color del dorso varía de café oscuro a café claro-rojizo (Ceballos y Oliva, 2005). Se distribuye en Argentina, Brasil, Bolivia, Granada (Antillas menores), Jamaica, México, Paraguay, Perú, Sur de las Guayanas, Trinidad y Venezuela. En México se le ha registrado en los estados de Chihuahua, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, México, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Yucatán, Zacatecas (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 6).

Habita en bosques, alimentándose de insectos, frutas, polen, néctar y partes florales. Estos murciélagos perchan en colonias con una cifra superior a 2,000 individuos en una gran

variedad de sitios incluyendo cuevas, minas abandonadas, túneles, huecos en árboles, alcantarillas en carreteras, edificios y puentes (Barquez *et al.*, 2008).



Figura 6. A. *Glossophaga soricina* (tomado de Ceballos y Oliva, 2005); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

***Artibeus jamaicensis* Leach, 1821**

Es de tamaño grande, están provistos de una hoja nasal erecta y una serie de verrugas en forma de “v” en el labio inferior. Carece de cola y el uropatagio se encuentra escotado. El pelaje es de color pardo oscuro, denso, pero no muy largo. Presenta dos líneas faciales tenues de color blanco en el rostro (Ceballos y Oliva, 2005). Se distribuye en regiones tropicales desde la vertiente costera de México hasta el norte de Argentina y Bolivia, Andes, Antillas, Bahamas, Ecuador y Perú. En México se le ha registrado en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, México, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 7).

Es frugívoro y complementa su dieta con insectos, polen, néctar y hojas; percha en una gran variedad de lugares que incluyen cuevas, follaje, agujeros de los troncos, edificios abandonados y túneles.

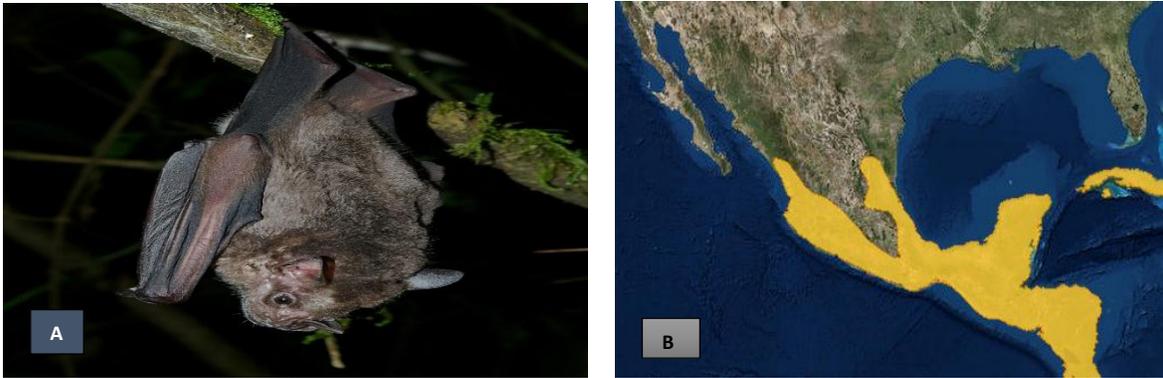


Figura 7. A. *Artibeus jamaicensis* (tomado de Ceballos y Oliva, 2005); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

***Carollia sowelli* Baker, Solari y Hoffmann, 2002**

Es un murciélago pequeño, el pelo del cuerpo es largo, denso y suave, el color varía en el vientre como en el dorso de pardo canela, gris oscuro a moreno grisáceo. Una característica importante son las cuatro bandas de color en el pelo de la región dorsal, la banda de la base y la subterminal son oscuras, la segunda banda y la punta son claras. Se distribuye desde el sureste de México, hasta Costa Rica y Panamá. En México se le ha registrado en los estados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz (Ceballos y Oliva, 2005) (Figura 8).

Habita en bosques húmedos tropicales perennifolios, aunque también se le ha recolectado en bosques tropicales caducifolios. Se alimenta principalmente de frutas como higos silvestres y posiblemente de algunos insectos, se refugia en cuevas, grietas de rocas, casas habitación y debajo de las hojas de plátano, forman colonias separadas de machos y hembras (Ceballos y Oliva, 2005).



Figura 8. A. *Carollia sowelli* (tomado de Flickr, 2015); B. Mapa de distribución en México (tomado y modificado de The IUCN Red List of Threatened Species, 2015).

IV. Objetivos

General

- Determinar la presencia de rickettsias (*Rickettsia*) en argásidos recolectados en cuevas de los estados de Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán, México mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final.

Particulares

- Identificar taxonómicamente las especies de argásidos recolectadas en cuevas del sur de México.
- Identificar la presencia de rickettsias mediante la amplificación y secuenciación de los genes que codifican la Citrato sintasa (*gltA*) y la proteína exterior de membrana A (*ompA*).
- Caracterizar molecularmente las especies de rickettsias recuperadas.

V. Área de estudio

Los muestreos de murciélagos y garrapatas se realizaron del 29 de marzo al 3 de abril y del 30 de septiembre al 6 de octubre de 2014, como parte del proyecto “Inventario de argásidos (Ixodidae: Argasidae) en cuevas de México. Huéspedes, distribución y relaciones filogenéticas (Papiit IN214114)”; durante estas salidas se visitaron un total de ocho cuevas distribuidas en cuatro estados: Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán (Figura 9).

Chiapas

Municipio San Fernando

Se encuentra en los límites del Altiplano Central y de las Montañas del Norte, limita al norte con Copainalá, al noreste con Chicoasén, al este con Osumacinta, al sur con Tuxtla Gutiérrez, y al oeste con Berriozábal. Su extensión territorial es de 258.30 km², con un clima subhúmedo con lluvias en verano y una vegetación compuesta por selva mediana y bosque de pino-encino (INAFED, 2015).

➤ Cueva del Guano

Se localiza en el Municipio de San Fernando, a 16°48'37.314"N y 93°10'30.3018"W, a 777 msnm, presentó una humedad relativa del 94% y una temperatura de 22°C.

Quintana Roo

Municipio Lázaro Cárdenas

Se encuentra en colindancia al norte con el Golfo de México, al este con los municipios de Isla Mujeres, Benito Juárez y Solidaridad, al sur con el municipio de Solidaridad y al oeste con el estado de Yucatán. Su extensión es de 3 881 km², con un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano y la vegetación es acuática y subacuática, de bosque espinoso y bosque tropical perennifolio (INAFED, 2015).

➤ Cueva de Zereque (Actun Tzuub)

Se localiza a 20°48'15" N y 87°28'34"W, a 14 msnm, presentó una humedad relativa del 92% y una temperatura de 27°C.

Tabasco

Municipio Macuspana

Se localiza en la región de la sierra y tiene como cabecera municipal a la ciudad de Macuspana, la que se ubica al sur del estado, colinda al norte con Centro, Centla y Jonuta; al este con el municipio de Jonuta y estado de Chiapas; al sur con el estado de Chiapas y el municipio de Tacotalpa; al oeste con los municipios de Tacotalpa, Jalapa y Centro. La extensión territorial es de 2, 551.70 km², el clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano, la vegetación es de selva perennifolia (INAFED, 2015).

- Cueva “Agua Blanca” (Grutas Ixta-Ha), Villahermosa

Se localiza a 17°37'11" N y 92°28'12" W, a 193 msnm, presentó una humedad relativa del 89% y 24°C de temperatura.

Yucatán

Municipio de Oxkutzcab

Es un municipio de la región sur, colinda al norte con Ticul-Santa Elena, al sur con Tekax, al este con Akil, al oeste con el estado de Campeche. La extensión del territorio es de 512.23 km², el clima es cálido-subhúmedo, la vegetación predominante es selva mediana subcaducifolia con vegetación secundaria (INAFED, 2015).

- Oquedad 2. Sobre la carretera Santa Elena-Loltun Km 156

Se localiza a 20°17'34" N y 89°38'42" W, a 98 msnm, presentó una humedad relativa del 79% y 30°C de temperatura.

Municipio Tecoh

Localizado en la región centro norte del estado, limita al norte con Timucuy, al sur con Chapab, al este con Cuzuma-Homun-Tekit y al oeste: Abala-Sacalum-Mérida. Tiene una extensión de 452.2 km², con un clima cálido sub-húmedo con lluvias en verano. La vegetación es selva baja caducifolia (INAFED, 2015).

- Cueva “Tzabnah” (13 cenotes)

Se localiza a 20°43'81" N y 89°28'46" W, a 16 msnm, presentó una humedad relativa del 93% y una temperatura de 26°C.

Municipio Tekax

Se localiza en la región sur del estado, limita al norte con Teabo, al sur con el estado de Campeche y Quintana Roo, al este con Tzucacab-Tixmeucac y al oeste con Akil-Oxkutzcab. Tiene una extensión de 3,819.61 km², el clima es cálido sub-húmedo, con lluvias en verano. La vegetación es de selva alta perennifolia (INAFED, 2015).

➤ Cueva “Chocantes”

Se localiza a 20°12'10''N y 89°17'58''W, a 91 msnm, presentó una humedad relativa del 91% y una temperatura de 27°C.

Municipio Homún

Se localiza en la región norte del estado, colinda al norte con Hocabá y Seyé, al sur con Tekit, al este con Huhí y Sanahcat, al oeste con Cuzamá y Tecoh. Tiene una extensión de 192.89 km², el clima es cálido sub-húmedo con lluvias en verano. La vegetación es de selva baja caducifolia (INAFED, 2015).

➤ Cueva cercana al cenote Bal-mil

Se localiza a 20°45'10'' N y 89°14'65'' W, a 16 msnm, presentó una humedad relativa del 98% y una temperatura de 27°C.

Municipio Kaua

Está ubicado en la región oriente del estado, limita al norte con el municipio de Uayma; al sur con Tekom, al este con Cuncunul y al oeste con Chankom y Tinum. Su extensión es de 214.60 km², con un clima cálido sub-húmedo con lluvias en verano y la vegetación es selva mediana subcaducifolia (INAFED, 2015).

➤ Cueva “Kaua”

Se localiza a 20°37'36'' N y 89°24'85'' W, a 24 msnm, presentó una humedad relativa del 85% y una temperatura de 27°C.



Figura 9. Ubicación geográfica de las cuevas visitadas en este estudio.

VI. Material y Métodos

En cada una de las cuevas visitadas se revisaron tres objetivos: 1) huéspedes, 2) paredes de las cuevas y 3) guano.

Trabajo de campo

Los murciélagos fueron recolectados utilizando redes de niebla, las cuales se colocaron en los sitios cercanos a las poblaciones de quirópteros o en las entradas de las cuevas. Cada huésped fue liberado de la red y mantenido en costales de manta hasta su posterior revisión (para evitar la pérdida o mezcla de ectoparásitos).

Los murciélagos recolectados fueron sacrificados mediante asfixia y fueron revisados colocándolos bajo el microscopio estereoscópico sobre una hoja de papel blanco; los ectoparásitos observados (incluyendo las garrapatas) fueron obtenidos con ayuda de pinzas de punta fina y agujas de disección, colocándolos en viales con etanol al 96% para su fijación y conservación. Los huéspedes fueron taxidermizados *in situ* e identificados por la Dra. Livia León Paniagua, para ser depositados posteriormente en la Colección de Mamíferos del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias, UNAM.

La recolección de ninfas y adultos de argásidos se llevó a cabo mediante la revisión de fisuras de las paredes de la cueva y tomando muestras de guano, el cual fue guardado en recipientes de plástico y transportados en una hielera hasta su posterior revisión. Las garrapatas colectadas *in situ* (con ayuda de pinzas de punta delgada), fueron fijadas y guardadas en viales con etanol al 96%. Las muestras de guano fueron procesadas en embudos de Berlese portátiles. Los ejemplares recolectados fueron colocados en viales con etanol al 96% para fijarlos y preservarlos hasta su identificación taxonómica.

Trabajo de laboratorio

El trabajo de identificación taxonómica de las garrapatas recolectadas se llevó a cabo en el Laboratorio de Acarología “Anita Hoffmann” de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Identificación taxonómica de las garrapatas

Para el montaje de las larvas recolectadas, se realizó una incisión en la región postero-dorsal del idiosoma y se colocaron en hidróxido de potasio (KOH) al 10% para retirar el exceso de contenido. Posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada durante 20 minutos y se transfirieron a ácido acético glacial al 10% por 10 minutos; después a alcohol isopropílico durante 20 minutos. A continuación, las garrapatas se colocaron en lactofenol para su aclarado durante algunos segundos, se les aplicó calor para acelerar el proceso. Finalmente se montaron entre portaobjetos y cubreobjetos, utilizando una gota de líquido de Hoyer como preservador. Una vez montados los ejemplares, se colocaron en cajas de preparaciones para completar el secado, se sellaron con glyptal y se etiquetaron.

El estudio taxonómico del material acarológico (garrapatas), se realizó con ayuda de un microscopio óptico (Leica-DM500) para las larvas, y un microscopio estereoscópico (Zeiss-475200-9901) para ninfas y adultos. La identificación de las especies se llevó a cabo utilizando claves taxonómicas especializadas tales como: Cooley y Kohls (1944) y Kohls *et al.* (1965).

Para confirmar la identidad conespecífica de los diferentes estados de desarrollo recolectados, se realizó la amplificación del gen 16S rDNA, usando los primers 16S (+) y 16S (-) propuestos por Norris *et al.* (2009), y bajo las condiciones de PCR propuestas por Trout *et al.* (2009) (Apéndice II).

Los ejemplares procesados e identificados fueron depositados en la Colección de Ácaros del Laboratorio de Acarología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en la Colección Nacional de Ácaros (CNAC) del Instituto de Biología de la UNAM.

Identificación molecular de rickettsias

El trabajo de Biología Molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la detección de rickettsias se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1) Extracción de DNA a partir de ejemplares preservados en etanol al 96% mediante el uso del Kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen (Apéndice I).
- 2) PCR punto final para la detección de *Rickettsia* sp. mediante la amplificación de un fragmento de 381 pb del gen que codifica para la citrato sintasa (*gltA*). Todas las muestras positivas fueron corroboradas mediante la amplificación de los fragmentos de 806 pb y 532 pb de los genes *gltA* y *ompA* (Apéndice II).
- 3) Electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Apéndice III).
- 4) Purificación y secuenciación (Apéndice IV).

La extracción de DNA se realizó mediante el uso del Kit “DNeasy Blood & Tissue” de Qiagen, utilizando los ejemplares preservados en etanol al 96%, los cuales se colocaron en cajas de Petri con papel absorbente para retirar el exceso de alcohol y a los cuales se les realizó una incisión en el idiosoma para la degradación del tejido por acción de la Proteinasa K y del buffer de lisis. Los ejemplares se colocaron en tubos Eppendorf y se incubaron a 56°C durante 24 horas; se recuperó el sobrenadante y se realizaron múltiples lavados para purificar el material genético (Apéndice I).

Para la detección de rickettsias se amplificó un fragmento de 381 pb de la citrato sintasa (*gltA*) utilizando las condiciones de Regnery *et al.* (1991) en un termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp 2700). Este gen es comúnmente utilizado para la identificación de las rickettsias debido a que se encuentra conservado en todas las especies del género *Rickettsia*, siendo uno de los más utilizados en la determinación de especies de este género bacteriano en artrópodos vectores como garrapatas y piojos.

Todas las muestras positivas fueron corroboradas mediante la amplificación parcial de la citrato sintasa (806 pb) utilizando las condiciones de De Souza *et al.* (2006) y la proteína exterior de membrana A (*ompA*) (Regnery *et al.*, 1991). Este último ha sido utilizado para la identificación de rickettsias, específicamente para las del grupo de las fiebres manchadas (Ver Apéndice II).

Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, y los positivos se enviaron para su secuenciación al Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

Las secuencias obtenidas se editaron y analizaron con el uso de los programas Chromas lite y MEGA 6. Estas secuencias se compararon con otras de la base de datos GenBank mediante el algoritmo BLAST y se alinearon junto con otras secuencias de referencia obtenidas de la misma base mediante el algoritmo de alineamiento pareado Clustal W con ayuda del programa MEGA 6.

Para identificar las distancias genéticas entre las secuencias se generó una matriz de distancias, a partir de la cual se construyó el dendrograma mediante el método de Neighbor-Joining, utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura tres parámetros, evaluando el soporte de ramas mediante 1000 réplicas de Bootstrap.

Es importante señalar que los huéspedes recolectados no fueron procesados mediante el análisis molecular.

VII. Resultados

Los resultados se presentan en tres secciones, la primera muestra la lista de las especies de argásidos identificados taxonómicamente, incluyendo además información sobre su distribución geográfica, huéspedes registrados y los ejemplares procesados para la detección molecular. En la segunda parte se muestran los resultados de la detección de rickettsias que incluye el alineamiento de las secuencias, la matriz de distancias y los dendrogramas. La última sección incluye los análisis ecológicos donde se muestran las prevalencias de cada rickettsia por cada oligonucleótido y especie de argásido.

Se identificaron un total de tres especies, pertenecientes a la familia Argasidae y al género *Ornithodoros*, recolectadas de un total de ocho cuevas: Cueva del Guano, San Fernando, Chiapas (CGSF); Oquedad 2, km 156 sobre carretera Santa Elena-Loltún, Yucatán (O2SE); Cueva Chocantes, Tekax, Yucatán (CCT); Cueva Tzabnah, Mérida, Yucatán (CTM); Cueva cercana a Bal-mil, Yucatán (CCB); Cueva Kaua, Kaua, Yucatán (CKK); Cueva Agua Blanca (Ixta-Ha), Villahermosa, Tabasco (ABV) y Cueva de Zereque (Actún Tzuub), Quintana Roo (CZT). Adicionalmente, se recolectaron 7 especies de murciélagos que no fueron analizados molecularmente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Registro de garrapatas y murciélagos recolectados en ocho cuevas del sur de México.

Cueva	Garrapatas recolectadas	Especies de murciélagos recolectadas	Fecha de recolecta
Chiapas			
Del Guano	2L, 3N,3H, 3M	<i>Desmodus rotundus</i> <i>Artibeus jamaicensis</i>	02 de abril del 2014
Quintana Roo			
De Zereque (Actun Tzuub)	1N, 3H	<i>Glossophaga soricina</i> <i>Carollia sowelli</i>	06 de octubre del 2014
Tabasco			
Agua Blanca, Grutas Ixta-ha	2M	<i>Balantiopteryx io</i>	30 de septiembre del 2014
Yucatán			
Oquedad 2. Sobre la carretera Santa Elena-Loltun Km 156	2N, 5H	<i>Diphylla ecaudata</i> <i>Glossophaga</i> sp. <i>Mimon cozumelae</i>	01 de octubre del 2014
Chocantes	3N, 3H	-	02 de octubre del 2014
Tzabnah (13 cenotes)	3H	<i>Glossophaga soricina</i>	03 de octubre del 2014
Cercana al cenote Balmil	1N, 1H, 2M	<i>Desmodus rotundus</i> <i>Diphylla ecaudata</i>	04 de octubre del 2014
Kaua	2N, 4H	-	05 de octubre del 2014

L=larva, N=ninfa, H=hembra, M=macho

Estudio Morfológico

Phylum Arthropoda

Clase Arachnida

Subclase Acari

Orden Ixodida

Familia Argasidae

Género *Ornithodoros*

- Diagnósis: Garrapatas con cuerpo más o menos aplanado, pero nunca marginado (excepto *Ornithodoros dyeri*), sin línea de sutura que separe la superficie dorsal de la ventral; tegumento de ninfas y adultos tuberculado o mamilado, sin espinas. Hipostoma de varias formas en ninfas y adultos, pero no vestigial. Mejillas presentes. Prolinencias y protuberancias dorsales en las patas, progresivamente más prominentes en los sucesivos estadios ninfales (Cooley & Kohls, 1944).

***Ornithodoros azteci* Matheson, 1935**

Hembra. Cuerpo piriforme, redondeado posteriormente y puntiagudo anteriormente, reduciéndose anteriormente a partir del tercer par de patas. Patas largas y débilmente micromamiladas. Coxas pequeñas, I y II separadas, todas las demás contiguas, mejillas grandes y reniformes. Camerostoma bien formado. Base del capítulo tan ancha como larga. Hipostoma largo, atenuado, puntiagudo y con los dientes muy finos, limitándose cerca del ápice, dientes en filas no definidas. Abertura genital en forma circular, entre la coxa I y II.

Macho. Similar a la hembra, pero con abertura genital en forma semicircular a nivel de la coxa I.

Ninfas. Similar a los adultos, pero sin abertura genital.

Larvas. Dorso con 17 a 21 pares de sedas, tarso I con 23 sedas; incluyendo 3 pares de sedas laterales. Hipostoma 4/4 en el tercio anterior y posteriormente 2/2 a la base. Órgano de Haller reticulado. Placa dorsal larga y triangular a piriforme.

- Distribución conocida: Colombia, Cuba, Jamaica, Panamá, sur de México, Trinidad y Tobago, Venezuela (Guglielmone *et al.*, 2003).
- Grupo de huéspedes asociados: Chiroptera
- Ejemplares analizados para rickettsias
Yucatán: 2N, 5H Oquedad 2, km 156 sobre carretera Santa Elena-Loltún, Oxkutzcab;
1H Cueva Kaua, Kaua.

***Ornithodoros brodyi* Matheson, 1935**

Hembra. Cuerpo ovalado, lados casi paralelos, un poco puntiagudo anteriormente y redondeado en la parte posterior. Patas largas y moderadas en tamaño, micromamiladas y con numerosas sedas finas. Coxas pequeñas, con las superficies granuladas, I y II separadas, todas los demás contiguas. Cuarto par de patas sin el mechón de sedas. Mejillas alargadas, con lados subparalelos, alcanzando la parte anterior más allá de la línea de unión cerca de un tercio de la longitud. Camerostoma bien desarrollado. Base del capítulo más amplia que larga, con la superficie irregular y micromamilada. Hipostoma largo con un patrón 2/2, con los laterales más grandes y numerosos, corona grande con numerosos dientes finos o ligeramente mellado. Abertura genital en forma circular, entre la coxa I y II.

Macho. Similar a la hembra, pero con abertura genital en forma semicircular a nivel de la coxa I.

Ninfas. Similar a los adultos, pero sin abertura genital.

Larvas. Dorso con 14 a 25 pares de sedas, tarso I con 21 sedas, incluyendo 2 pares de sedas laterales; ventralmente con 9 pares de sedas más una seda posteromedial. Apéndices de las patas y sedas muy largas. Hipostoma surge de una muy larga extensión media subtriangular de la base del capítulo, dentición 3/3 hasta 5/5 en la porción anterior. Órgano de Haller reticulado. Placa dorsal larga y triangular a piriforme.

- Distribución conocida: USA, Colombia, Cuba, Guatemala, sur de México, Panamá, Venezuela y República Dominicana (Guglielmone *et al.*, 2003).
- Grupo de huéspedes asociados: Chiroptera
- Ejemplares analizados para rickettsias
Chiapas: 2L Cueva del Guano, San Fernando, ex *Desmodus rotundus*; 3N, 3M, 3H Cueva del Guano, San Fernando. Yucatán: 2N, 3H Cueva Kaua, Kaua; 3H Cueva Tzabnah, Tecoh.
Tabasco: 2M Cueva Agua Blanca, Macuspana. Quintana Roo: 1N, 3H Cueva de Zereque, Lázaro Cárdenas.

***Ornithodoros yumatensis* Cooley y Kohls, 1941**

Hembra. Cuerpo ovalado, lados casi paralelos, puntiagudo anteriormente y redondeado posteriormente. Patas largas y esbeltas, con las superficies irregulares con numerosas granulaciones. Mechón de sedas en el tarso del cuarto par de patas. Coxas I y II un poco separadas, todas las demás contiguas. Mejillas grandes, alrededor de dos veces más largo que ancho, y con muy pocas sedas cortas. Camerostoma indefinido. Base del capítulo sobresaliente. Hipostoma con lados subparalelos, ápice medianamente mellado. Dientes pequeños o débiles, más grande en las filas laterales y progresivamente más pequeños hacia la línea media. Abertura genital en forma circular, entre las coxas I y II.

Macho. Similar a la hembra, pero con hipostoma y dientes relativamente más pequeños, con abertura genital en forma semicircular a nivel de la coxa I.

Ninfas. Similar a los adultos, pero sin abertura genital.

Larvas. Dorso con 17 a 21 pares de sedas, tarso I con 23 sedas; ventralmente con 8 pares de sedas más una seda posteromedia. Hipostoma 4/4 en el tercio anterior y posteriormente 2/2 a la base. Órgano de Haller reticulado. Placa dorsal larga y triangular a piriforme.

- Distribución conocida: USA, Colombia, Nicaragua, Venezuela, sur de México y El Salvador (Guglielmone *et al.*, 2003).
- Grupo de huéspedes asociados: Chiroptera
- Ejemplares analizados para rickettsias
Yucatán: 3N, 3H Cueva Chocantes; 1N, 2M, 1H Cueva cercana a Bal-mil, Homún.

Estudio Molecular

Se procesaron un total de 43 argásidos: 2 larvas, 12 ninfas, 22 hembras y 7 machos, recolectadas de ocho cuevas pertenecientes a cuatro estados de la República Mexicana. Las dos larvas analizadas se encontraron asociadas con *Desmodus rotundus*, el resto de las garrapatas fueron recolectadas en las paredes de las cuevas visitadas. Del primer gen analizado (*gltA* 381pb) para detectar la presencia de rickettsias, 23 ejemplares resultaron positivos, sin embargo, de éstas solo se obtuvieron secuencias completas para 15 ejemplares (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ejemplares de garrapatas analizados con el fragmento de 381 pb del gen *gltA* para la detección de rickettsias.

Cueva	Especie de garrapata	L	N	♀	♂	Sitio de recolecta	Gen <i>gltA</i> positivas
Chiapas							
CGSF	<i>O. brodyi</i>	2	3	3	3	<i>D. rotundus</i>	1L,3N, 1♀, 2♂
Yucatán							
CTM	<i>O. brodyi</i>	0	0	3	0	Paredes	1♀
CKK	<i>O. brodyi</i>	0	2	3	0	Paredes	0
	<i>O. azteci</i>	0	0	1	0		1♀
O2SE	<i>O. azteci</i>	0	2	5	0	Paredes	1N, 4♀
CCT	<i>O. yumatensis</i>	0	3	3	0	Paredes	1N, 3♀
CCB	<i>O. yumatensis</i>	0	1	1	2	Paredes	1♀, 1♂
Tabasco							
ABV	<i>O. brodyi</i>	0	0	0	2	Paredes	0
Quintana Roo							
CZT	<i>O. brodyi</i>	0	1	3	0	Paredes	1N, 2♀
Total		2	12	22	7	43	23 ejemplares: 1L, 6N, 13♀, 3♂

L=larva, N=ninfa, ♀=hembra, ♂=macho

Para la identificación específica de las rickettsias con los fragmentos 806 pb y 532 pb de los genes *gltA* y *ompA*, 17 y 12 muestras resultaron positivas respectivamente, de estas se obtuvieron secuencias completas para 14 y 6 muestras respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ejemplares analizados para la detección de rickettsias con los fragmentos de 806 pb y 532 pb de los genes *gltA* y *ompA*.

Localidad	Especie	L	N	♀	♂	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>
Chiapas							
CGSF	<i>O. brodyi</i>	1	4	1	2	3N, 1♀, 2♂	1N, 1♀, 1♂
Yucatán							
O2SE	<i>O. azteci</i>	0	1	0	0	1N	0
CCT	<i>O. yumatensis</i>	0	1	3	0	1N, 3♀	1N, 3♀
CTM	<i>O. brodyi</i>	0	0	1	0	0	0
CCB	<i>O. yumatensis</i>	0	0	1	1	1♀, 1♂	1♀, 1♂
CKK	<i>O. azteci</i>	0	0	1	0	1♀	0
Quintana Roo							
CZT	<i>O. brodyi</i>	0	1	2	0	1N, 2♀	1N, 2♀
Total		1	7	10	3	17 ejemplares: 6N, 8♀, 3♂	12 ejemplares: 3N, 7♀, 3♂

L=larva, N=ninfa, ♀=hembra, ♂=macho

Análisis de las secuencias

Se utilizó el alineamiento local (BLAST) para comparar las secuencias obtenidas con las de referencia que se encuentran en la base de datos de GenBank, las secuencias obtenidas exhibieron porcentajes de similitud superiores al 96% en relación con cinco especies de rickettsias (Cuadro 5).

Particularmente el uso del fragmento del gen *gltA* 381 pb, nos permitió solo la identificación de la presencia/ausencia de rickettsias en nuestras muestras. Las muestras que

resultaron positivas con este análisis fueron amplificadas y secuenciadas usando fragmentos de genes más específicos (806 pb y 532 pb de los genes *gltA* y *ompA*) para la determinación de las especies. Con el fragmento del gen 381 pb y usando el BLAST obtuvimos una similitud con cuatro taxones: *Rickettsia bellii*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia felis* y *Rickettsia lusitaniae* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas en el presente trabajo y las secuencias de GenBank.

Especie de garrapata	No. secuencias analizadas	Porcentaje (%) de similitud	Especie de <i>Rickettsia</i>	No. de acceso
381 pb <i>gltA</i>				
<i>O. azteci</i>	2	99	<i>R. felis</i>	AF210692
<i>O. azteci</i>	1	99	<i>R. monacensis</i>	JX040639
<i>O. brodyi</i>	1	99	<i>R. bellii</i>	EU430258
<i>O. brodyi</i>	2	99	<i>R. felis</i>	AF210692
<i>O. brodyi</i>	4	100	<i>R. lusitaniae</i>	JQ771933
<i>O. yumatensis</i>	1	100	<i>R. bellii</i>	EU430258
<i>O. yumatensis</i>	4	98, 99(2) y 100	<i>R. lusitaniae</i>	JQ771933
806 pb <i>gltA</i>				
<i>O. azteci</i>	2	96, 97	<i>R. rhipicephali</i>	CP013133
<i>O. brodyi</i>	8	92(1), 99(7)	<i>R. bellii</i>	AF497584
<i>O. yumatensis</i>	4	99	<i>R. lusitaniae</i>	JQ771933
532 pb <i>ompA</i>				
<i>O. yumatensis</i>	6	99	<i>R. lusitaniae</i>	JQ771935

() El valor entre paréntesis indica el número de secuencias obtenidas en este trabajo con el porcentaje de similitud señalado con respecto a las secuencias comparadas de GenBank.

Alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas para los fragmentos 806 pb y 532 pb de los genes *gltA* y *ompA* se alinearon con secuencias pertenecientes a la familia Rickettsiaceae, las 14 secuencias del fragmento de 806 pb se alinearon con 25 secuencias de la base de datos. Por último, para el fragmento 532 pb del gen *ompA* se utilizaron 19 secuencias de la base de datos y 6 como resultado de este estudio (Apéndice V y VI).

El alineamiento para el fragmento 806 pb del gen *gltA* estuvo conformado por 39 secuencias con una longitud de 600 pb de longitud. El alineamiento para el fragmento 532 pb del gen *ompA* estuvo conformado por 25 secuencias con una longitud de 480 pb.

Con base en la matriz de distancias se generó un dendrograma para los fragmentos 806 pb y 532 pb de los genes *gltA* y *ompA* mediante el método de Neighbor-Joining (Figura 10 y 11).

Al analizar las secuencias con el fragmento 806 pb del gen *gltA*, la identificación de las especies se redujo a tres grupos cercanos a: 1) *R. belli* asociada con *O. brodyi*, con secuencias pertenecientes a dos estados, Chiapas y Quintana Roo; 2) *R. lusitaniae* asociada con *O. yumatensis* para el estado de Yucatán y 3) una tercera especie no identificada (*Rickettsia* sp.) asociada con *O. azteci* para el estado de Yucatán (Figura 10).

Por último, las secuencias analizadas en este estudio con el gen *ompA* estuvieron asociadas con *O. yumatensis* para el estado de Yucatán y conforman un grupo relacionado con *R. ca lusitaniae* (Figura 11).

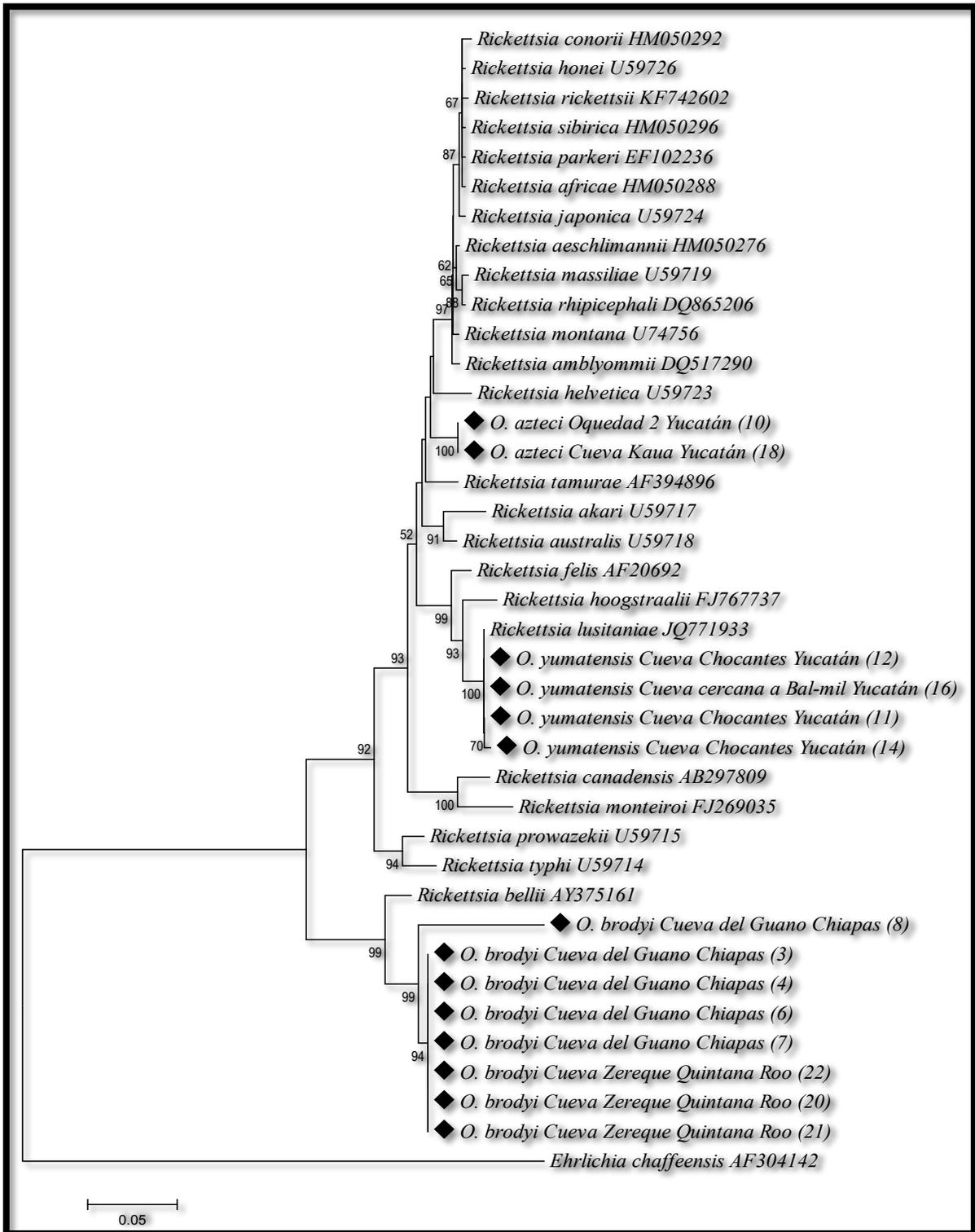


Figura 10. Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor-Joining utilizando el fragmento de 806 pb del gen *gltA* donde se muestran las relaciones génicas entre las secuencias de *Rickettsia* detectadas en las diferentes especies de garrapatas recolectadas y las obtenidas de GenBank.

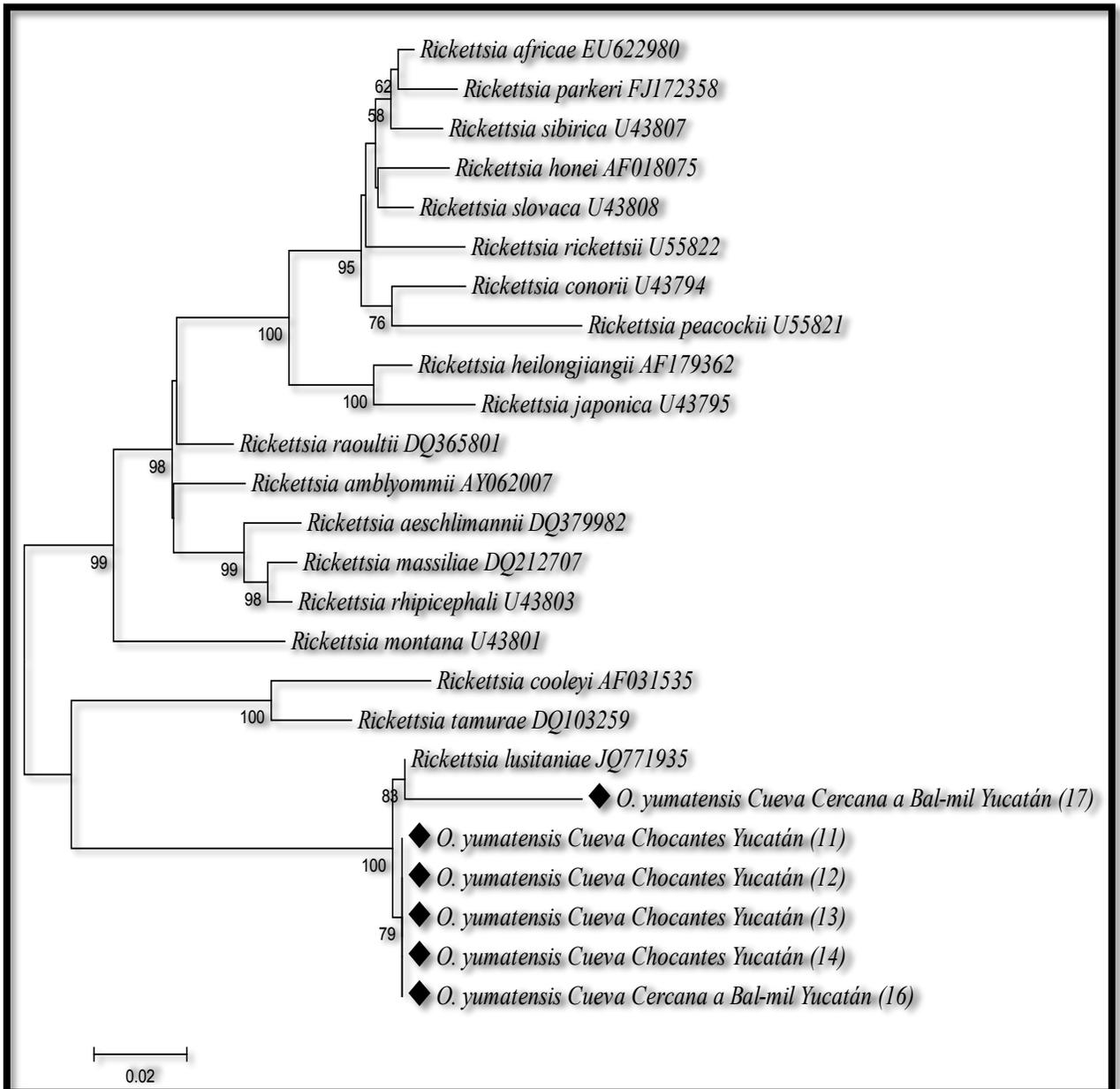


Figura 11. Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor-Joining utilizando el fragmento de 532 pb del gen *ompA* donde se muestran las relaciones génicas entre las secuencias de *Rickettsia* detectadas en las garrapatas recolectadas y las obtenidas de GenBank.

Análisis ecológico

Se llevó a cabo la caracterización de las infestaciones mediante el análisis de la prevalencia, que se define como el porcentaje de huéspedes infectados por una especie de bacteria, es decir el porcentaje de argásidos de una especie asociados con una especie de *Rickettsia* en particular (Bush *et al.*, 1997) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prevalencia de las especies de rickettsias en relación con las especies de garrapatas.

Especie de Garrapata	Cueva	Especie de rickettsia	Prevalencia (%)
806 pb <i>gltA</i>			
<i>O. azteci</i> n=2	O2SE	<i>Rickettsia</i> sp.	100
	CKK		
<i>O. brodyi</i> n=8	CGSF CTZ	<i>R. ca. bellii</i>	67
<i>O. yumatensis</i> n=4	CCT CCB	<i>R. ca. lusitaniae</i>	67
532 pb <i>ompA</i>			
<i>O. yumatensis</i> n=6	CCT CCB	<i>R. ca. lusitaniae</i>	100

VIII. Discusión

De acuerdo con Venzal *et al.* (2015) la familia Argasidae está conformada actualmente por 200 especies a nivel mundial, de las cuales 32 se han registrado en México, lo que representa el 16% del total. El estudio de esta familia en el país está aún lejos de ser completado; específicamente en cuanto a patógenos, únicamente se habían registrado a *Ornithodoros nicollei* y *Otobius lagophilus* como portadoras de microorganismos (Silva-Goytia y Elizondo, 1952).

A partir de los resultados obtenidos en este estudio pudimos incrementar la información que existe sobre rickettsias asociadas con argásidos en tres estados de la República Mexicana (Chiapas, Quintana Roo y Yucatán).

La identificación específica de las garrapatas recolectadas es uno de los puntos clave en la relación huésped-parásito. En particular para argásidos, Venzal *et al.* (2015) refirieron que los adultos y ninfas del género *Ornithodoros* carecen de caracteres morfológicos adecuados para su identificación específica ya que la taxonomía del grupo está basada principalmente en los estados larvarios. En este estudio se procesaron muestras de larvas, ninfas y adultos las cuales fueron identificadas morfológicamente y adicionalmente antes de la búsqueda de patógenos se corroboró la identificación utilizando el gen 16s rDNA, asociando las secuencias de los diferentes estados obtenidos. De esta forma, estas identificaciones nos permitieron nombrar a los posibles vectores de las rickettsias encontradas.

La identificación de las rickettsias se logró parcialmente a partir de la amplificación y secuenciación de fragmentos de genes específicos. En primer lugar la amplificación con el gen *gltA* 381 pb permitió el reconocimiento de la presencia o ausencia de bacterias del género *Rickettsia*, ya que al usarlo y secuenciarlo obtuvimos un primer reconocimiento de cuatro taxones (*R. bellii*, *R. felis*, *R. lusitaniae* y *R. monacensis*); sin embargo, cuando amplificamos con el fragmento de *gltA* 806pb, se identificaron sólo tres taxones (*R. ca. bellii*, *R. ca. lusitaniae* y *Rickettsia* sp.), lo anterior nos mostró que el primer fragmento es muy sensible para la detección del patógeno pero poco específico para la identificación de especies, y esto está dado principalmente por la longitud del producto de PCR que amplifica, por lo cual se debe de reconsiderar su uso para reconstrucciones de identidad específica y posición

taxonómica. De acuerdo con Regnery *et al.* (1991) el fragmento 381 pb del gen *gltA* solo identifica la presencia de bacterias pertenecientes al género *Rickettsia*, pero no permite diferenciar si se trata del grupo de Tifo o Fiebre Manchada. Recientemente se ha señalado que este fragmento de gen puede amplificar otros productos bacterianos como *Bartonella*, dado el diseño (de oligonucleótidos). Por tal motivo se utilizó el fragmento 806 pb del gen *gltA* que resulta más extenso y no presenta reacción cruzada con otro grupo bacteriano. De igual forma se decidió utilizar un segundo gen (*ompA*) que puede diferenciar a las rickettsias del grupo de Fiebres Manchadas, lo que nos permitió confirmar la presencia de *R. lusitaniae*.

Rickettsia bellii fue descrita por Philip *et al.*, 1983, y ha sido referida como una especie endosimbionte (Regnery *et al.*, 1991; Bermúdez *et al.*, 2012), es decir, no está considerada como patógena, lo cual la diferencia de otras especies como por ejemplo *R. rickettsii*. Ogata *et al.* (2006) menciona que se puede transmitir transováricamente por lo que su papel como potencial patógeno es incierto. De igual forma estos autores encontraron que en condiciones de laboratorio, mamíferos infectados (cobayos y conejos) con esta rickettsia, presentaron un cuadro semejante al de las especies patógenas (reacciones inflamatorias ligeras y escaras necróticas). Sin embargo el inóculo fue muy elevado y no se realizó por la vía natural por lo que aún queda mucho por estudiar.

Por su parte, Parola *et al.* (2005) citaron que hay especies que han sido descritas inicialmente como no patógenas como por ejemplo *Rickettsia parkeri*, pero que actualmente se sabe que si lo son pudiendo causar un tipo de fiebre manchada, menos patógena que *Rickettsia rickettsii*, con síntomas tales como: fiebre, dolor de cabeza, malestar general, mialgias y artralgias difusas, múltiples escaras en las extremidades inferiores y erupción maculopapular. Lo anterior nos sugiere que aún faltan estudios que complementen la información acerca de su posible papel como especie patógena. Esta especie ha sido referida por Philip *et al.* (1983) y Ogata *et al.* (2006) en asociación con otras especies de garrapatas tales como: *Dermacentor andersoni* y *Amblyomma* sp. Para nuestro país esta es la primera vez que se cita asociada con argásidos (*Ornithodoros brodyi*), y para los estados de Chiapas y Quintana Roo.

Rickettsia lusitaniae fue descrita recientemente por Milhano *et al.* (2014); fue encontrada asociada con *Ornithodoros erraticus* en Portugal y es considerada una especie

patógena, la cual está incluida en el grupo de las Fiebres Manchadas. En nuestro estudio la registramos como una especie cercana a *R. lusitaniae* (presentando una alta similitud molecular), asociada con garrapatas del mismo género, pero de diferente especie (*Ornithodoros yumatensis* en Yucatán). Para la corroboración de las especies se requiere del aislamiento que permita la identificación específica de estos organismos como lo mencionan Fournier *et al.* (2003).

Mientras que *Rickettsia* sp. (colectada de *Ornithodoros azteci* en Yucatán) no pudo ser identificada y aparece en el dendrograma como una rama genéticamente diferente al resto de las rickettsias analizadas a pesar de presentar una similitud de un 97 y 96% con *Rickettsia rhipicephali*, especie incluida en el grupo de las Fiebres Manchadas. Por lo cual se requieren de nuevas colectas para obtener más secuencias, así como el aislamiento de la *Rickettsia* que permitan analizar si se trata de un nuevo taxón.

Aunque los métodos moleculares como la amplificación y secuenciación permiten el reconocimiento de rickettsias, Labruna *et al.* (2007) mencionaron que una herramienta importante para la determinación de estos patógenos es el aislamiento de las especies encontradas. De tal forma se requieren nuevos estudios que permitan el aislamiento de las bacterias encontradas para lograr su identificación específica.

En cuanto a las especies de argásidos identificadas en este estudio, poco se conoce sobre su biología, asimismo, no se tienen registros sobre si pueden o no infestar a humanos; sin embargo, el encontrar garrapatas parasitadas con rickettsias, sugiere la importancia de estos organismos en el mantenimiento de ciclos enzoóticos. Su papel como vectores es también desconocido, por lo que sin duda es necesario realizar nuevos estudios en este sentido. Otros aspectos que necesitan ser estudiados son las condiciones que favorecen su transmisión, su mantenimiento, y las especies de vertebrados que actúan como reservorios.

El haber encontrado larvas, ninfas y adultos parasitados por rickettsias nos sugiere tres posibles maneras de adquirir a la bacteria, 1) por transmisión horizontal, lo cual nos indica que el huésped porta a las rickettsias y las garrapatas al alimentarse contraen a la bacteria; 2) las hembras porten a las rickettsias y se presenta la transmisión transovárica, y 3) que la transmisión sea transestadial es decir que de un estado de desarrollo pase a su siguiente estado y se mantengan de esta forma a las rickettsias. El estudio de rickettsias asociadas con argásidos es limitado por lo cual para poder conocer las posibles vías de

transmisión se requieren realizar más estudios encaminados al mantenimiento de las garrapatas en laboratorio o a partir de infección artificial por modelos murinos, como lo realizaron Ogata *et al.* (2006).

La estimación del riesgo de infección por patógenos transmitidos por garrapatas es un determinante crítico del desarrollo de métodos selectivos de la interrupción de los ciclos de enfermedades zoonóticas (Smith *et al.*, 2010). La alta tasa de supervivencia de los argásidos podría influir en la capacidad de determinadas especies y sus estados de desarrollo para transmitir las bacterias, el parasitismo en masa de larvas no ingurgitadas puede aumentar la posibilidad de infección (Bermúdez *et al.*, 2012).

Otra causa que contribuye a la ampliación del hábitat de las garrapatas a nuevas regiones geográficas y por ende de sus patógenos asociados, es debido a los eventos de migración de los huéspedes, un claro ejemplo son las aves migratorias, las cuales actúan como vectores a larga distancia de varios agentes microbianos (por ejemplo rickettsias) y enfermedades humanas (Elfving, 2013). Por este motivo se debe conocer bien la biología de los huéspedes y sus posibles relaciones conforme a su hábitat y distribución, ya que se conoce que los murciélagos son importantes reservorios de ectoparásitos, que ellos tienen capacidad migratoria y además la mayoría habita en colonias o grupos.

Se sabe que el ciclo de vida de las rickettsias involucra factores tanto ecológicos como climáticos, así como la presencia de vertebrados. La complejidad de las interacciones entre agente, vector, reservorio y medio ambiente, y de todos estos a su vez con el hombre, hacen que la comprensión integral de la ecoepidemiología de las rickettsiosis requiera de enfoques multidisciplinarios, con participación de ciencias como ecología, entomología, epidemiología, medicina, microbiología y ciencias sociales (Quintero *et al.*, 2013).

Finalmente este trabajo contribuye al conocimiento de las rickettsias en general y en particular al conocimiento de rickettsias asociadas con argásidos. Estos resultados no son concluyentes pero aportan un punto de partida para continuar el estudio de estos organismos en nuestro país.

IX. Conclusiones

- ❖ Este estudio representa el primer trabajo de rickettsias asociadas con argásidos en México.
- ❖ Se refiere por primera vez a las especies *Ornithodoros azteci*, *Ornithodoros brodyi* y *Ornithodoros yumatensis* como portadores de rickettsias.
- ❖ Se citan por primera ocasión a *R. ca. bellii*, *R. ca. lusitaniae* y *Rickettsias* sp. asociadas con *O. brodyi*, *O. yumatensis* y *O. azteci* respectivamente en México.
- ❖ *Rickettsia ca. belli* fue encontrada en ninfas y adultos (hembras y machos) recolectados en dos cuevas de los estados de Chiapas y Quintana Roo.
- ❖ *Rickettsia ca. lusitaniae* se recolectó en ninfas y adultos (hembras y machos) de dos cuevas del estado de Yucatán
- ❖ *Rickettsia* sp. fue encontrada en ninfas y adultos (hembras) de dos cuevas del estado de Yucatán.
- ❖ Se registran por primera vez rickettsias asociadas con garrapatas para los estados de Chiapas y Quintana Roo.
- ❖ Los hallazgos en este estudio indican que en los estados de Yucatán, Quintana Roo y Chiapas ocurren varias especies del género *Rickettsia*, algunas de ellas cercanas a las especies con potencial patógeno y otras cuya patogenicidad está por estudiarse.
- ❖ Se requiere de nuevas recolectas que ayuden al conocimiento sobre rickettsias asociadas con argásidos, y su papel como potenciales vectores en nuestro país.

- ❖ Se debe continuar con el desarrollo e implementación de métodos moleculares para conocer el papel que juegan los artrópodos y huéspedes vertebrados en el ciclo de transmisión de rickettsias lo cual podría guiar en la evaluación del riesgo y medidas de control de las rickettsiosis.

X. Bibliografía

- ◆ Alcántara V. E., Gallardo, E. G., Hong, C. and Walker, D. H. (2004). Typhus Group Rickettsiae Antibodies in Rural Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 549-550.
- ◆ Álvarez-Hernández, G. (2010). La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, una epidemia olvidada. *Salud pública de México*, 52, 1-3.
- ◆ Anderson, J. y Magnarelli L. (2008). Biology of Ticks. *Infection Diseases Clinics*, 22, 195–215.
- ◆ Arroyo-Cabrales, J., Miller, B., Reid, F., Cuarón, A.D. and De Grammont, P.C. (2008). The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015.2. Recuperado el 14 de agosto, 2015 de: www.iucnredlist.org.
- ◆ Barquez, R., Pérez, S., Miller, B. and Díaz, M. (2008). The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015.2. Recuperado el 13 de Agosto, 2015 de: www.iucnredlist.org.
- ◆ Bermúdez, S., Miranda, R., Zaldívar, Y., González, P., Berguido, G., Trejos, D., Pascale, J. M. y Labruna, M. (2012). Detección de Rickettsia spp. en ectoparásitos de animales domésticos y silvestres de la Reserva Natural Privada Cerro Chucantí y comunidades aledañas, Panamá, 2007-2010. *Biomédica*, 32, 189-95.
- ◆ Bernabeu, M. y Segura, F. (2005). Enfermedades producidas por Rickettsia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23,163-72.
- ◆ Bush, A., Lafferty K. y Lotz J. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms. *Journal of Parasitology*, 83, 575-583.

- ◆ Bustamante, M. E. (1943). Una nueva rickettsiosis en México. Existencia de a Fiebre Manchada Americana en los estados de Sinaloa y Sonora. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 4, 189-210.
- ◆ Bustamante, M. E. y Varela, G. (1944). Características de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en Sonora y Sinaloa, México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 5, 129-136.
- ◆ Bustamante, M. E. y Varela, G. (1946). Estudios de Fiebre Manchada en México. Hallazgo del *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado en Veracruz. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 7, 75-78.
- ◆ Bustamante, M. E. y Varela, G. (1947). Distribución de las rickettsiasis en México (Tifo murino, tifo clásico y fiebre manchada). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 8, 3-14.
- ◆ Ceballos G., y Oliva, G. (2005). *Los mamíferos silvestres de México*. Ciencia y Tecnología. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- ◆ Cooley, R. A. y Kohls, G. L. (1944). The Argasidae of North America, Central America and Cuba. The American Midland Naturalist, Monograph No.1. The University of Notre Dame, Notre Dame.
- ◆ Cortés, V.J. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. *Biomédica*, 31, 268-283.
- ◆ Cortes-González, M. y Gámez-Moreno, R. (2008). Tifus epidémico en Nuevo León: presentación del primer caso clínico pediátrico. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 22, 56-59.
- ◆ Crofton, H. (1971). A model of host-parasite relationships. *Parasitology*, 63, 343-364.

- ◆ De la Fuente, J. (2008). Ticks as vectors of pathogens that a cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6938-6946.

- ◆ de Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J., Walker, D. y Bacellar, F. (2006). *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1103-1108.

- ◆ Dzul-Rosado, K., Peniche-Lara, G., Tello-Martín, R., Zavala-Velázquez, J., de Campos Pacheco, R., Labruna, M.B., Sánchez, E.C. y Zavala-Castro, J. (2013). *Rickettsia rickettsii* isolation from naturally infected *Amblyomma parvum* ticks by centrifugation in a 24-well culture plate technique. *Open Veterinary Journal*, 3, 101-105.

- ◆ Elfving, K. (2013). *Epidemiological and Bacteriological Aspects of Spotted Fever Rickettsioses in Humans, Vectors and Mammals in Sweden*. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 888.

- ◆ Eremeeva, ME., Zambrano, M. L., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S. E., Santos-Silva, M.M., Salceda, B., MacBeth, D., Olguin, H., Dasch, G. A. and Aranda, C. A. (2011). *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *Journal Medical Entomology*, 48, 418-421.

- ◆ Fernández, S. P. (2003). Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección moleculaza de los patógenos que albergan. Tesis doctoral. Facultad de Biología, Universidad de Salamanca. España, Castilla y León.

- ◆ Field-Cortazares, J., Escárcega-Ávila, A. M., López-Valencia, G., Barreras-Serrano, A. y Tinoco-Gracia, L. (2015). Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a

riquetsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos de Ensenada, Baja California, México. *Gaceta Médica de México*, 151, 42-46.

- ◆ Flickr. 2015. Recuperado el 13 de Agosto del 2015 de: <https://www.flickr.com/photos/12742129@N07/4942878403>
- ◆ Flickriver. 2015. Recuperado el 13 Agosto 2015 de: <http://www.flickriver.com/photos/26500525@N08/4291334206/>
- ◆ Fournier, P. E., Dumler, J. S., Greub, G., Zhang, J., Wu, Y. y Raoult, D. (2003). Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41, 5456–5465
- ◆ Global Biodiversity Information Facility. 2015. Recuperado el 13 de Agosto 2015 de: <http://www.gbif.org/>
- ◆ Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada, A., Horak, I., Shao, R. y Barker, S. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1-28.
- ◆ Hoffmann, A. (1962). *Monografía de los Ixodoidea de México: I parte*. Laboratorio de Ecología y Paleontología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México, D.F.
- ◆ Hoffmann, A. (1988). *Animales desconocidos: Relatos acarológicos*. SEP, cfe La ciencia, 60 desde México, México D.F.
- ◆ Hoffmann, C. C. (1925). La fiebre manchada de Choix. *Bol. del Depto. de Salubridad Pública*, 1, 35-37.

- ◆ Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Recuperado el 27 agosto, 2015 de: <http://www.inafed.gob.mx>

- ◆ Keirans, J. E. (2009). Order Ixodida. En G.W. Krantz and D.E. Walter (Eds.), *A manual of Acarology* (pp. 11-123), Texas Tech University Press, Lubbock, Texas.

- ◆ Keirans, J. E., Clifford, C.M., Hoogstraal, H. y Easton, E.R. (1976). Discovery of *Nuttalliella namaqua* Bedford (Acarina: Ixodoidea: Nuttalliellidae) in Tanzania and Redescription of the Female Based on Scanning Electron Microcopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 69, 925-932.

- ◆ Kohls, G. M., Sonenshine, D. E. y Clifford, C. M. (1965). The Systematics of the Subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the Larve the Western Hemisphere and Descriptions of Three Nex Species. *Annals of the Entomological Society of America*, 58, 331-364.

- ◆ Labruna M. B., Mattar, S., Nava, S., Bermúdez, S., Venzal, J.M., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., De Souza, R., Oteo, J. y Zavala-Castro, J. (2011). Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Rev. MVZ Córdoba*, 16, 2435-2457.

- ◆ Labruna, M. B., Pacheco, R. C., Nava, Santiago., Brandao, P. E., Richtzenhain, L. J. and Guglielmone, A. A. (2007). Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* Ticks from Argentina. *Microbial Ecology*, 54, 126–133.

- ◆ Lim, B., Miller, B., Reid, F., Arroyo-Cabrales, J., Cuarón, A.D. and De Grammont, P.C. (2008). The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015.2. Recuperado el 11 de agosto, 2015 de: www.iucnredlist.org.

- ◆ Lindquist, E.E., Krantz, G.W. y Walter, D.E. (2009). Classification. En G.W. Krantz y D.E. Walter (Eds.), *A manual of Acarology* (pp. 97-103). Texas Tech University Press, Lubbock, Texas.
- ◆ Mariotte, C. O., Bustamante, M. E. y Varela, G. (1944). Hallazgo de *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (México). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 5, 297-300.
- ◆ Martín del Campo L. A., Magdaleno, A. A., Partida, P. y Ramos Rodríguez, H.J. (2010). Primer reporte de infección por *Rickettsia rickettsii* en Guadalajara, México. *Medicina Interna de México*, 26, 183-185.
- ◆ Martínez-Medina, M. A., Álvarez-Hernández, G., Padilla-Zamudio, J.G. y Rojas-Guerra, M. G. (2007). Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en niños: consideraciones clínicas y epidemiológicas. *Gaceta Médica de México*, 143, 1-4.
- ◆ Martínez-Medina, M. A., Solís-Gallardo, L. P., Padilla-Zamudio, G. y Guevara-Tovar, M. (2005). Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. Informe de dos casos. *Gaceta Médica de México*, 141, 1-4.
- ◆ Medina-Sánchez A., Bouyer, D. H., Alcántara-Rodríguez, V., Mafra, C., Zavala-Castro, J., Whitworth, T., Vsevolod, L. P., Fernández-Salas, I. and Walker, D. H. (2005). Detection of a Typhus Group Rickettsia in *Amblyomma* Ticks in the State of Nuevo Leon, Mexico. *Ann. New York Academy of Sciences*, 1063, 327–332.
- ◆ Mercado Uribe M. C., Martínez Arce, P. A., García, H. C. y Casillas, P. P. (2006). Tifo epidémico en Jalisco, presentación de un caso clínico pediátrico. *Emerging Infectious Microbiology*, 26, 64-66.

- ◆ Milhano, Natacha., Palma, Mariana., Marcili, Arlei., Nuncio, M. S., Lopes de Carvalho, I. y de Sousa, R. (2014). *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37, 189–193.

- ◆ Nava, S., Guglielmono, A. A. y Mangold, A. J. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, 14, 2857-2877.

- ◆ Nicholson W.L., Sonenshine, D.E., Lane, R.S. y Uilengerg, G. (2009). Ticks (Ixodida). En: G. R. Mullen y L. A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 493-538). Elsevier, Amsterdam.

- ◆ Norris, D.E., Klompen, J. S. H., Keirans, J. E. Black IV, W. C. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal Medical Entomology*, 33, 78-89.

- ◆ Ogata, H., La Scola, B., Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C., Fournier, P. E., Claverie, J. M. y Raoult, D. (2006). Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. *PLoS Genetics*, 2, 733-744.

- ◆ Oliveira, K.A., Pinter, A., Medina-Sánchez, A., Boppana, V.D., Wikel, S.K., Saito, T.B., Shelite, T., Blanton, L., Popov, V., Teel, P. D., Walker, D.H., Galvao, M.M., Mafra, C. and Bouyer, D. H. (2010). *Amblyomma imitator* Ticks as Vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 1282-1284.

- ◆ Ortiz Mariotte, C., Bustamante, M. E. y Varela, G. (1944). Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora (México). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 4, 297-300.

- ◆ Panti-May, J. A., Torres-Castro, M., Hernández-Betancourt, S., Dzul-Rosado, K., Zavala-Castro, J., López-Avila, K. y Tello-Martín, R. (2014). Detection of *Rickettsia felis* in Wild Mammals from Three Municipalities in Yucatan, Mexico. *EcoHealth*, 1-5.
- ◆ Parola, Philippe., Davoust, Bernard. y Raoult Didier. (2005). Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res*, 36, 469–492.
- ◆ Peniche-Lara, G., Dzul-Rosado, K., Pérez-Osorio, C. y Zavala-Castro, J. (2015). *Rickettsia typhi* in rodents and *R. felis* in fleas in Yucatan as a possible causal agent of undefined febrile cases. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57, 129-132.
- ◆ Pérez, T.M., Guzmán, C.C., Montiel, P.G., Paredes, L. y Rivas, G. (2013). Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 1-9.
- ◆ Philip R. N., Casper, E. A., Anacker, R. L., Cory, J., Hayes, S. F., Burgdorfer, W. and Yunker, C.E. (1983). *Rickettsia bellii* sp. nov.: a Tick-Borne Rickettsia, Widely Distributed in the United States, That Is Distinct from the Spotted Fever and Typhus Biogroups. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, 94-106.
- ◆ Regnery, R. L., Spruill, C. L. y Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes. *Journal of Bacteriology*, 173, 1576-1589.
- ◆ Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE). Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud. (2010). Rickettsiosis. Semana 6. *Boletín Epidemiológico*, 6, 1-5.
- ◆ Smith, Michael P., Ponnusamy, Loganathan., Jiang, Ju., Abu Ayyash, Luma., Richards, Allen L. and Apperson, Charles S. (2010). Bacterial Pathogens in Ixodid

Ticks from a Piedmont County in North Carolina: Prevalence of Rickettsial Organisms. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 10, 939-952.

- ◆ Sánchez-Montes, S., Guzmán-Cornejo C., Ramírez-Corona, F., León-Paniagua, L. (2016). Sucking lice (Insecta: Psocodea: Anoplura) associated with rodents distributed in the Neotropical region of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87 (en prensa).
- ◆ Silva-Goytia, R. y Elizondo, A. (1952). Estudio de Fiebre Manchada en México. II. Parásitos hematófagos encontrados naturalmente infectados. *Revista Medicina de México*, 32, 278-282.
- ◆ Sonenshine, D.E. (1991). *Biology of Ticks: Volume 1*. Oxford University. Oxford, New York.
- ◆ Sonenshine, D.E., Lane, R. and Nicholson, W.L. (2002). Ticks (Ixodida). En G. Mullen and L. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 517-55), Oxford University, New York, Oxford.
- ◆ The IUCN Red List of Threatened Species, 2015. Disponible en: <http://maps.iucnredlist.org/map.html>.
- ◆ Trout, R. T., Steelman, C. D and Szalanski, A. L. 2009. Population genetics and phylogeography of *Ixodes scapularis* from canine and deer in Arkansas southwest. *Entomology*, 34, 273-287.
- ◆ Quintero, J. C., Londoño, A. F., Díaz, F. J., Agudelo-Flórez., Arboleda, M. y Rodas, J.D. (2013). Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia. *Biomédica*, 33, 38-51.

- ◆ Venzal, J. M., González-Acuña, D., Muñoz-Leal, S., Mangold, A. J. y Nava, S. (2015). Two new species of *Ornithodoros* (Ixodida; Argasidae) from the Southern Cone of South America. *Exp Appl Acarology*, 66, 127–139.
- ◆ Zarate–Aquino, M. L. (1992). Las rickettsias y las rickettsiasis en México. En: G.A. Escobar, G. J. Valdespino, A. J. Sepulveda (Eds), *Vacunas, ciencia y salud* (296–299), Secretaría de Salud, México, D.F.
- ◆ Zavala-Castro J. E., Zavala-Velázquez, J. E., Peniche-Lara, G. F. and Sulú Uicab, J. E. (2009). Human Rickettsialpox, Southeastern Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 1665-1667.
- ◆ Zavala-Castro J. E., Zavala-Velázquez, J. E., Walker, D. H., Ruiz Arcila, E. E., Laviada-Molina, H., Olano, J. P., Ruiz-Sosa, J. A., Small, M. A. and Dzul-Rosado, K. R. (2006). Fatal Human Infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 672-674.
- ◆ Zavala-Castro J. E., Zavala-Velázquez, J.E. and Sulú Uicab, J. E. (2009). Murine Typhus in Child, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 972-974.
- ◆ Zavala-Castro, J. E., Dzul-Rosado, K. R., Arias León, J. J., Walker, D. H. and Zavala-Velázquez J. E. (2008). An Increased in Human Cases of Spotted Fever Rickettsiosis in Yucatan, Mexico, Involving Children. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, 907–910.
- ◆ Zavala-Castro, J. E., Dzul-Rosado, K., Peniche-Lara, G., Tello-Martín, R. y Zavala-Velázquez, J. E. (2014). Isolation of *Rickettsia typhi* from Human, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 1411-1412.

- ◆ Zavala-Castro, J. E., Zavala-Velázquez, J. E., García, M., Arias León, J. J. and Dzul-Rosado, K. R. (2009). A Dog Naturally Infected with *Rickettsia akari* in Yucatan, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9, 345-347.

- ◆ Zavala-Velázquez J. E., Xue-jie, Yu. and Walker, D. H. (1996). Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 157-159.

- ◆ Zavala-Velázquez, J., Laviada-Molina, H., Zavala-Castro, J., Pérez-Osorio, C., Becerra-Carmona, G., Ruiz-Sosa, J. A., Bouyer, D. H. and Walker, D. H. (2006). *Rickettsia felis*, the agent of an emerging infectious disease: Report of a new case in Mexico. *Archives of Medical Research*, 37, 419–422.

- ◆ Zavala-Velázquez, J.E., Ruiz-Sosa, J., Vado-Solis, I., Billings, A. N. y Walker, D. H. (1999). Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatán: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 405–408.

- ◆ Zavala-Velázquez, J.E., Zavala-Castro, J.E., Vado-Solís, I., Ruiz-Sosa, J.A., Moron, C.G., Bouyer, D.H. y Walker, D. H. (2002). Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 2, 69-75.

Apéndice I. Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el uso del Kit “DNeasy Blood & Tissue Kit” de Qiagen, implementado el protocolo “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)” con las siguientes modificaciones.

1) Se utilizaron ejemplares preservados en etanol al 96%, los cuales se colocaron en papel absorbente para retirar el exceso del mismo (para evitar una posible interferencia con la PCR).

1.1 Para los ejemplares adultos se realizó una incisión en posición ventral entre el tercer y cuarto par de patas (con ayuda de tijeras rectas, las cuales fueron esterilizadas previas a la realización de los cortes con una solución de cloro al 5% y posteriormente en etanol al 70%).

1.2 En el caso de larvas y ninfas se realizó una pequeña abertura hacia la porción más distal del idiosoma y en la base del gnatosoma con ayuda de una aguja estéril.

2) Se colocó al ejemplar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de Proteínasa K. La solución se mezcló con ayuda del vórtex durante 15 segundos.

3) La muestra se incubó a una temperatura de 56°C durante 24 horas para que el Buffer de lisis y la Proteínasa degradaran el tejido blando.

4) Pasadas las 24 horas se homogenizó la solución con ayuda del vórtex (durante 15 segundos).

5) Se adicionaron 200 µl del Buffer AL y 200 µl de Etanol Absoluto Grado Biología Molecular.

6) Se recuperó la solución (aproximadamente 850 µl y se depositó en una columna DNeasy, la cual se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, descartando el sobrenadante y el tubo de colecta.

7) Se ajustó un nuevo tubo de colecta a la columna y se adicionaron 500 µl del Buffer AW1, centrifugando por un minuto a 8,000 rpm y descartando nuevamente tanto el sobrenadante como el tubo de colecta.

8) Se ajustó un nuevo tubo de colecta y se adicionaron 500 µl del Buffer AW2, centrifugando por tres minutos a 14,000 rpm para lavar la membrana DNeasy.

9) Finalmente se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 µl pipeteando directamente sobre la membrana DNeasy:

9.1 100 µl del Buffer AE en el caso de adultos

9.2 50 µl del Buffer AE para larvas y ninfas.

10) El tubo se incubó a temperatura ambiente durante tres minutos y se centrifugó a 8,000 rpm durante un minuto, desechando la columna y rotulando el tubo Eppendorf con el código completo del ejemplar. El DNA se congeló a una temperatura de -20°C hasta su uso.

Apéndice II. Amplificación del DNA

Para la identificación conespecifica de los argásidos se amplificó un fragmento de ≈ 400 pb del gen 16S, utilizando el par de primers propuestos por Norris *et al.* (1996). Para la identificación de las rickettsias se utilizaron los fragmentos de *gltA* (uno de 381 pb, otro de 806 pb) y *ompA* (532 pb), se amplificaron utilizando los siguientes pares de primers propuestos por Regnery *et al.* (1991) y de Sousa *et al.* (2006).

Gen	Primers	Secuencia (5'→3')	Perfil térmico	Detección	Autor
16S	16S (+)	CCGGTCTGAACTCA GATCAAGT	95°C 2' (95° 30" 35X 55° 30") 72° 1'	Identificación de argásidos	Norris <i>et al.</i> , 1996
	16S (-)	CTGCTCAATGATTTT TTAAATTGCTGTGG			
<i>gltA</i> (Citrato sintasa)	RpCs877 (Forward)	GGGGGCCTGCTCAC GGCGG	95° 5' (94° 30" 30X 48° 30") 45° 30" 72° 5'	Todas las rickettsias	Regnery <i>et al.</i> , 1991
	RpCs1258 (Reverse)	ATTGCAAAAAGTAC AGTGAACA			
	RpCS.415 (Forward)	GCTATTATGCTTGC GGCTGT	94° 2' (94° 30" 35X 58° 30") 72° 1.30' 72° 7'		de Sousa <i>et al.</i> , 2006
	RpCS.1220 (Reverse)	TGCATTTCTTTCCAT TGTGC			
<i>ompA</i> (190-kDa)	Rr190.70 (Forward)	ATGGCGAATATTTT TCCAAAA	95°C 5' (95° 30" 30X 50° 30") 72° 30" 72° 8'	Rickettsias del grupo de fiebres manchadas	Regnery <i>et al.</i> , 1991
	Rr190.602 (Reverse)	AGTGCAGCATTCGC TCCCCCT			

Para amplificar el DNA, se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) siguiendo las especificaciones de Sánchez-Montes *et al.* (2016):

Reactivo	Concentración	Por reacción
Taq PCR Master Mix de Qiagen:		
MgCl ₂	25 mM	
dNTP's	10 mM	12.5 µl
Buffer de reacción	10x	
Taq polimerasa	5 unidades/µl	
Forward	2 µM	1 µl
Reverse	2 µM	1 µl
ddH ₂ O libre de nucleasas (MiliQ)		2 µl
DNA	30-50 ng/µl	8.5 µl
Total		25 µl

Apéndice III. Electroforesis

Los productos de PCR se corroboraron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% tiñéndose con SYTO 60 nucleic stain (Invitrogen by Life Technologies CA, USA), utilizando 2 µl del marcador molecular de 100 pb (Nucleic Acid Markers, 100 pb DNA Ladder, Axygen). Los geles se corrieron durante 35 minutos a 85 V (utilizando buffer TAE 1X como buffer de corrida) y se visualizaron en un fotodocumentador ODDISSEY CLx Imaging System (LICOR Biosciences).

Apéndice IV. Secuenciación

Una vez corroborados los productos de PCR, se enviaron para su secuenciación al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM a cargo de la M. en C. Laura Márquez. En donde el procedimiento se lleva a cabo a través del secuenciador 3500xl de 24 capilares (*Life Technology*).

Apéndice V. Especies de referencia utilizadas para los alineamientos

Especie	No. de acceso den GenBank	
	<i>gltA</i> 806 pb	<i>ompA</i> 532 pb
<i>R. prowazekii</i>	U59715	-
<i>R. typhi</i>	U59714	-
<i>R. bellii</i>	AY375161	-
<i>R. canadensis</i>	AB297809	-
<i>R. helvética</i>	U59723	-
<i>R. rickettsii</i>	KF742602	U55822
<i>R. conorii</i>	HM050292	U43794
<i>R. africae</i>	HM050288	EU622980
<i>R. honei</i>	U59726	AF018075
<i>R. slovacá</i>	-	U43808
<i>R. parkeri</i>	EF102236	FJ172358
<i>R. japónica</i>	U59724	U43795
<i>R. akari</i>	U59717	L01461
<i>R. australis</i>	U59718	-
<i>R. felis</i>	JQ674484	AY727036
<i>R. massiliae</i>	U59719	DQ212707
<i>R. montanensis</i>	U74756	U43801
<i>R. rhipicephali</i>	DQ865206	U43803
<i>R. aeschlimannii</i>	HM050276	DQ379982
<i>R. monacensis</i>	-	-
<i>R. tamurae</i>	AF394896	DQ103259
<i>R. asiática</i>	-	-
<i>R. monteiro</i>	FJ269035	-
<i>C.R. lusitaniae</i>	JQ771933	JQ771935
<i>R. heilongjiangii</i>	-	AF179362
<i>R. raoultii</i>	-	DQ365801
<i>R. paecockii</i>	-	U55821
<i>R. amblyommii</i>	DQ517290	AY062007
<i>R. cooleyi</i>	-	AF031535
<i>R. hoogstraalii</i>	FJ767737	-
<i>R. sibirica</i>	HM050296	U43807
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	AF304142	-

Matriz de similitud de distancias genéticas para el alineamiento con el fragmento 532 pb del gen de *ompA* generado con el modelo de Tamura 3 parámetros.

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1)																								
2)	90.5																							
3)	96.5	91.8																						
4)	91.8	95.8	93.1																					
5)	95.1	91.6	96.7	93.1																				
6)	81.4	85.6	82.2	86.5	82.9																			
7)	94.1	91.3	94.8	92.8	93.3	83.1																		
8)	96.3	91.0	97.9	92.3	95.5	81.9	93.6																	
9)	92.6	90.5	93.3	91.0	92.3	82.2	97.0	92.0																
10)	82.0	85.6	84.6	86.7	82.6	84.5	83.1	84.0	81.9															
11)	90.8	97.7	92.1	95.8	91.8	85.6	91.6	91.3	90.3	85.9														
12)	88.7	92.5	89.4	93.5	89.2	86.5	90.5	88.6	88.6	85.3	92.0													
13)	95.5	91.3	98.4	92.6	95.8	81.6	94.3	96.7	92.8	83.1	91.6	88.9												
14)	93.3	88.9	94.1	89.4	94.3	79.8	91.0	93.3	89.7	78.8	88.4	86.4	93.0											
15)	92.3	95.8	93.6	97.2	92.9	86.5	93.6	92.8	92.9	88.1	96.0	93.5	93.1	89.2										
16)	96.3	91.6	98.4	92.8	96.5	82.5	94.1	96.7	92.6	84.0	91.8	89.2	97.4	93.3	93.6									
17)	96.8	91.8	98.4	93.1	96.5	82.5	94.6	97.7	93.1	83.7	92.1	90.0	97.5	94.6	93.9	97.7								
18)	82.3	87.1	83.7	89.0	84.1	94.8	83.7	83.4	83.1	87.3	87.1	87.6	83.1	81.6	87.9	83.4	84.3							
19)	90.8	97.7	92.1	95.8	91.8	85.6	92.3	91.3	91.0	85.9	98.9	92.0	91.5	88.3	96.3	91.8	92.1	87.1						
20)	81.7	85.6	84.3	86.7	82.9	85.1	82.8	83.7	81.6	99.5	85.9	85.9	82.8	79.1	87.6	83.7	83.4	87.3	85.9					
21)	81.7	85.6	84.3	86.7	82.9	85.1	82.8	83.7	81.6	99.5	85.9	85.9	82.8	79.1	87.6	83.7	83.4	87.3	85.9	100.0				
22)	81.7	85.6	84.3	86.7	82.9	85.1	82.8	83.7	81.6	99.5	85.9	85.9	82.8	79.1	87.6	83.7	83.4	87.3	85.9	100.0	100.0			
23)	81.7	85.6	84.3	86.7	82.9	85.1	82.8	83.7	81.6	99.5	85.9	85.9	82.8	79.1	87.6	83.7	83.4	87.3	85.9	100.0	100.0	100.0		
24)	81.7	85.6	84.3	86.7	82.9	85.1	82.8	83.7	81.6	99.5	85.9	85.9	82.8	79.1	87.6	83.7	83.4	87.3	85.9	100.0	100.0	100.0	100.0	
25)	77.9	81.7	80.6	82.9	78.5	80.2	79.0	80.0	77.8	96.3	82.0	81.4	79.1	74.5	84.4	80.0	79.7	83.2	82.0	95.8	95.8	95.8	95.8	95.8

1) *R. rickettsii* U55822, 2) *R. aeschlimannii* DQ379982, 3) *R. africae* EU622980, 4) *R. amblyommii* AY062007, 5) *R. conorii* U43794, 6) *R. cooleyi* AF031535, 7) *R. heilongjiangii* AF179362, 8) *R. honei* AF018075, 9) *R. japonica* U43795, 10) *R. lusitaniae* JQ771935, 11) *R. massiliae* DQ212707, 12) *R. montana* U43801, 13) *R. parkeri* FJ172358, 14) *R. peacockii* U55821, 15) *R. raoultii* DQ365801, 16) *R. sibirica* U43807, 17) *R. slovacica* U43808, 18) *R. tamurae* DQ103259, 19) *R. rhipicephali* U43803, 20) *O. yumatensis* Cueva Chocantes Yucatán (11), 21) *O. yumatensis* Cueva Chocantes Yucatán (12), 22) *O. yumatensis* Cueva Chocantes Yucatán (13), 23) *O. yumatensis* Cueva Chocantes Yucatán (14), 24) *O. yumatensis* Cueva Cercana a Bal-mil Yucatán (16), 25) *O. yumatensis* Cueva Cercana a Bal-mil Yucatán (17).

