



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Identificación de las subespecies de *Francisella tularensis*
en muestras de mamíferos pequeños en el estado de
Hidalgo, México.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DIANA MELISSA NAVARRETE SOTELO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. INGBORG BECKER FAUSER

Ciudad Universitaria, CD. Mx., 2018



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

Navarrete

Sotelo

Diana Melissa

5534245823

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311006946

2. Datos del tutor

Dra.

Ingeborg Dorothea

Becker

Fauser

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Daniel Sokani

Sánchez

Montes

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María de Lourdes

Segura

Valdez

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Fernando Alfredo

Cervantes

Reza

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Pablo Francisco

Colunga

Salas

7. Datos del trabajo escrito

Identificación de las subespecies de *Francisella tularensis* en muestras de mamíferos pequeños en el estado de Hidalgo, México.

51 p

2018

Agradecimientos

Este trabajo representa un gran esfuerzo en el que contribuyeron muchas personas y hoy es finalmente culminado gracias

A la Biól. Ali Zeltzin Lira Olguin y al Dr. César Antonio Ríos Muñoz por su apoyo en la colecta de los mamíferos.

A la Dra. Livia Socorro León Paniagua, al Dr. Lázaro Guevara López y al Biol. Martín Yair Cabrera Garrido por su apoyo en la identificación de mamíferos.

Al Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes por su apoyo y dirección en la estandarización de las actividades de biología molecular (extracción, PCR, electroforesis) y el análisis para la identificación molecular (edición y alineamiento de secuencias con el programa MEGA 6.0).

A la M en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por su apoyo técnico en la secuenciación de los productos de PCR.

Al M en C. Pablo Francisco Colunga Salas por su apoyo en los análisis de sistemática molecular.

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser jefa del Centro de Medicina Tropical en la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM por su apoyo en la elaboración de esta tesis

A los programas PAPIIT IN217515 y CONACyT 221405.

Dedictoria

A mi mamatz por darme siempre lo mejor para cumplir mis objetivos, enseñarme que todo se puede con esfuerzo, dedicación y tenacidad. Gracias por siempre estar presente en los momentos más importantes, por confiar en mí, nunca abandonarme, consentirme, ser mamá, papá, amiga. gracias mamá por tus consejos, cariños, por abrazarme fuerte cuando no son buenos días. Es bonito tenerte a mi lado y esperar después de un día estresado o una semana cansada, disfrutar juntas de una rica cena o una noche de pelis con palomitas. Te amo.

A mis abuelitos por siempre preocuparse por mí, ser mis compañeros y cuidarme. A mi abuelita por contarme sus historias del rancho que realmente son muy bellas y a mi abuelito

por levantarme temprano y enseñarme palabras y frases poco usuales, pero que me dejaron enseñanzas y momentos cómicos.

A mí tía Mary la Dra. por brindarme su apoyo incondicional, consejos, preocuparse siempre por mi salud y mis malos hábitos. A mis primos Facalo y Moshura por molestarme todos los domingos y hacerme la vida más liviana, por llenar a la familia de buenos momentos, risas y por esas buenas salidas a toquines y a la cineteca.

A mis primos/hermanos, André por pasar muchas madrugadas conmigo inspirándome con su música clásica mientras yo hacía tarea, por ser tan risueño y chistoso, gracias cerdito!! Tanis por preocuparte en todo momento por mí, cuidarme y amarme.

A mi prima Kenia que, aunque no nos veamos muy seguido, siempre nos ayudaremos incondicionalmente, chiquita gracias por siempre ver lo mejor de mí y motivarme, por ser mi compañera de juegos y compartir travesuras. A mí tío Aristeo por ilustrarme con sus charlas y su refinado gusto gastronómico.

A Ale Sánchez por acompañarme desde el primer día en la carrera y desde entonces apoyarnos en las malas y en las peores, también en momentos de party, por ser mi compañera de karaoke y bailongo.

Al Dr. Kevin, “Vilchis” ... gracias por tan buenos momentos de risa, party loca, pero sobre todo por aquellos verdaderos instantes que sólo se hacen llevaderos si cuentas con personas como tú, sinceras y apasionadas. Gracias por compartir esta pasión, desveladas, tareas, prácticas, taller, quejas, congresos etc. Eres mi mejor amigo, y aunque no son muchos años de amistad, considero que han sido más suficientes para saber que eres una persona que vale oro.

Y por supuesto para cerrar con broche de oro, no podías faltarme tú ...Matita!!! mi persona ideal y compañero de vida: No hay palabras para describir ni agradecer tanto. Gracias a esta pasión compartida por la Biología fue como nos conocimos, definitivamente eres lo más hermoso que me dejó la carrera y hoy estamos juntos en esta etapa tan importantes en nuestras vidas. Es increíble compartir esto contigo, la persona que ha estado a mi lado cada instante desde que comenzó esta aventura llamada Biología Gracias por enseñarme a soñar en grande, por siempre sacarme miles de risas. Así que dame la mano a vamos a continuar con esta aventura.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Taxonomía	3
2.2 Distribución Geográfica	6
2.4 Hospederos	9
2.5 Vectores	10
2.6 Transmisión	11
2.7 Ciclo de vida de <i>Francisella tularensis</i>	12
2.8 Cuadro clínico	13
3. Antecedentes	14
4. Hipótesis	21
5 Objetivo general	21
5.1 Objetivos particulares	21
6. Material y Métodos	22
6.1 Trabajo de campo	22
6.1.1 Área de estudio	22
6.1.2 Colecta de hospederos	22
6.1.3 Extracción y preservación de órganos	23
6.1.4 Identificación de mamíferos pequeños	23
6.2 Trabajo de Laboratorio	23
6.2.1 Extracción de DNA de tejidos	23
6.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	24
6.2.3 Electroforesis	25
6.2.4 Secuenciación	25
6.2.5 Análisis de datos	25
6.2.6 Distribución geográfica	26
7. Resultados	26
Colecta de hospederos	26
PCR	28
8. Discusión	33
9. Conclusiones	36

10. Referencias.	37
11. Anexos	46
11.1 Anexo I: Extracción de DNA de tejido.	46
11.2 Anexo II: Biología del hospedero	47
11.3 Anexo III	55
Dendrograma de las subespecies de <i>Francisella tularensis</i> realizado con el método de Neighbor Joining,	55

Navarrete Sotelo D. M. (2018). Identificación de las subespecies de *Francisella tularensis* en muestras de mamíferos pequeños en el estado de Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. pp

1. Resumen

Francisella tularensis es una bacteria Gram negativa, conformada por cuatro subespecies de cocobacilos pequeños, aerobios, considerados como patógenos intracelulares facultativos, y conocido por ser el agente causal de la Tularemia en Norteamérica. Esta bacteria se asocia con múltiples hospederos vertebrados (e.g. lagomorfos y roedores) y vectores (e.g. garrapatas y moscas hematófagas) que mantienen el ciclo en la naturaleza. Sin embargo, el ser humano puede adquirir esta enfermedad principalmente por mordedura del vector o en menor proporción por la ingesta de agua, alimentos o aspiración de la bacteria. En EEUU se han notificado múltiples brotes de Tularemia en población humana; en contraste, en México los casos se han notificado de manera aislada y no se cuenta con monitoreo en fauna silvestre. Un sólo estudio en México ha demostrado evidencia serológica, la presencia de *F. tularensis* en *Odocoileus virginianus* en los estados de Nuevo León y Coahuila. Por otro lado, en el estado de Hidalgo existen registros de múltiples géneros de roedores (e.g. *Microtus*, *Rattus* y *Sciurus*) y especies de garrapatas (e.g. *Dermacentor variabilis* y *Amblyomma americanum*), incriminados como reservorios y vectores de esta bacteria. En México los registros de *F. tularensis* han sido escasos, el más actual data de 1992, esto aunado a su importancia médico-veterinaria por su alta tasa de mortalidad y por estar incriminada en casos de fiebre de origen desconocido es relevante su identificación por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de *F.*

tularensis en muestras de tejido de mamíferos pequeños recolectados en el estado de Hidalgo, México. Para ello se recolectaron roedores sinantrópicos y silvestres con ayuda de trampas tipo Sherman, durante el periodo comprendido entre agosto y septiembre del 2015. Los ejemplares fueron sacrificados y se obtuvo un fragmento de tejido, el cual se fijó en etanol absoluto. Para la detección de *F. tularensis* se implementó la técnica de PCR para la amplificación de un producto de 400 pb del gen que codifica la proteína de 17kDA. Se detectó la presencia ADN de *F. tularensis* en dos individuos de *Peromyscus beatae*, los cuales suponen los primeros registros de esta bacteria en poblaciones de roedores en el país y evidencian la necesidad de implementar estudios extensivos y exhaustivos para conocer la distribución real de este patógeno en el país.

2. Introducción

Francisella tularensis es un cocobacilo inmóvil, gram negativo, pleomórfico de 0.1-1 mm de ancho y 0.1-3 mm de largo, cuya temperatura y pH óptimos para su crecimiento es de 37°C y 6.9, respectivamente. Este microorganismo bacteriano exhibe un complejo ciclo de vida que incluye diversos tipos de artrópodos hematófagos (*eg.* garrapatas, tábanos y mosquitos) y hospederos vertebrados, en los cuales se comporta como patógeno intracelular facultativo, que puede crecer dentro de diferentes tipos de células, incluyendo macrófagos, hepatocitos y células epiteliales (Mandell et al., 2005; Lopes et al., 2009; Foley y Nieto, 2010; Cowley y Elkins, 2011).

2.1 Taxonomía

Francisella tularensis es un miembro de la clase Gammaproteobacteria, y es la única especie patógena de las cuatro especies reconocidas del género: *F. tularensis*, *Francisella hispaniense*, *Francisella philomiragia* y *Francisella noatunensis* [Figura 1].

Este taxón forma un clado monotípico cuyo representante es un endosimbionte de artrópodos denominado originalmente como *Wolbachia*

Clasificación	
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Thiotrichales
Familia	Francisellaceae
Género	<i>Francisella</i>
Especie	<i>F. tularensis</i>

pérsica, por cuestiones de similitud morfológica a través de microscopía óptica con *Wolbachia pipientis*, por la incapacidad de crecer en medios libres de células y la predilección por los tejidos reproductivos (Suitor y Weiss, 1961; Suitor, 1964; Weiss et al., 1984). Estudios posteriores demostraron que el gen 16S rRNA parcialmente secuenciado de *Wolbachia persica* comparte similitud con el género *Francisella* (Weisburg et al., 1989; O'Neill et al., 1992; Forsman et al., 1994; Niebylski et al., 1997; Noda et al., 1997; Dumler et al., 2001). Estos análisis filogenéticos mostraron que *Wolbachia persica* estaba estrechamente relacionada con el género *Francisella* dentro de la clase Gammaproteobacteria (Familia Francisellaceae) y no con el género *Wolbachia*, miembro de la clase Alphaproteobacteria (Familia Anaplasmataceae); (Larson et al., 2016). Todas estas especies se relacionan lejanamente con otros patógenos de humanos, como *Coxiella burnetii* y *Legionella pneumophila*, agentes etiológicos de la Fiebre Q y de la Enfermedad del Legionario, respectivamente [Figura 2] (Larsson et al., 2005).

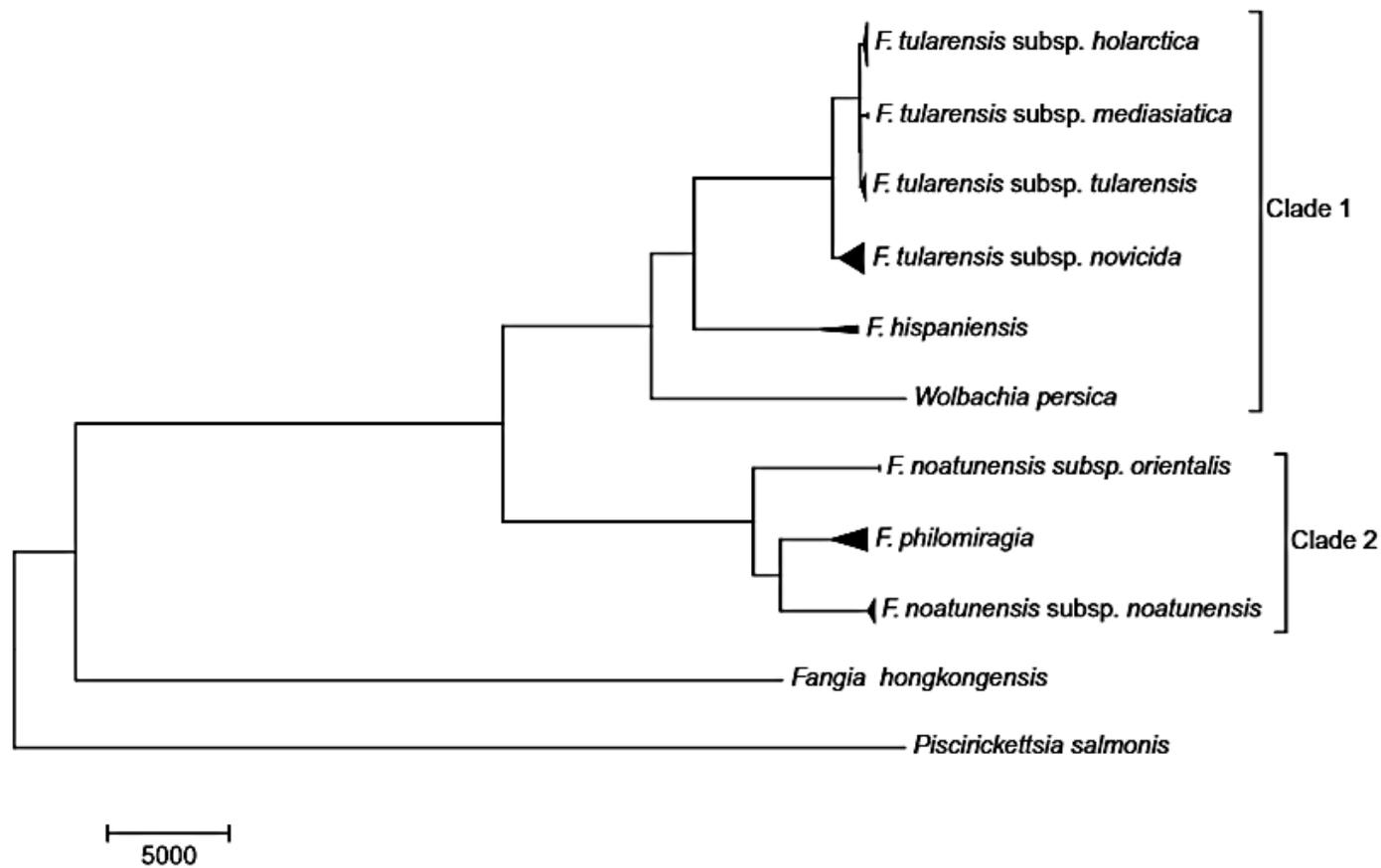


Figura 1.- Filogenia del género *Francisella* basada en el análisis de polimorfismo de un sólo nucleótido (SNPs) a partir de genoma completo. El género *Francisella* se divide en dos grupos: el clado 1 (*F. tularensis* y *F. hispaniensis*) y el clado 2 (*F. noatunensis* y *F. philomiragia*) que ocupan hábitats tanto terrestres como acuáticos y marinos, respectivamente. *Fangia hongkongensis* y *Piscirickettsia salmonis* conforman los grupos externos Tomado y modificado de Johansson et al., 2015.

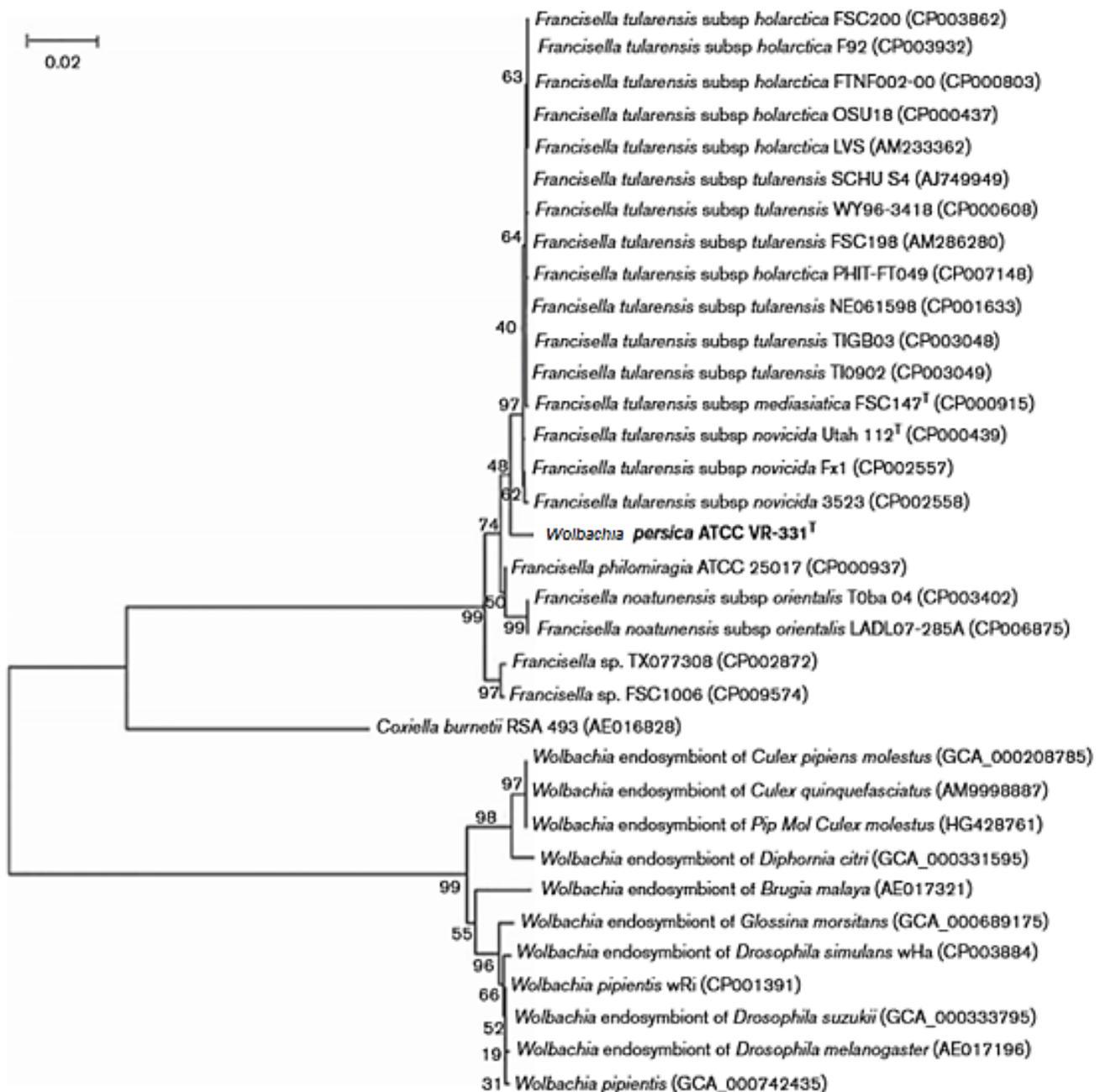


Figura 2.-Dendrograma del género Francisella basada en secuencias del gen 16S rRNA que muestra la relación de *Wolbachia persica* ATCC VR-331T con miembros representativos de los géneros Francisella y Wolbachia Sólo las secuencias del gen 16S rRNA de longitud completa se incluyeron en el análisis. *Coxiella burnetii* RSA 493 se usó como grupo externo. Los números de acceso de GenBank se proporcionan en paréntesis. El árbol fue construido utilizando el método Neighbour-Joining. Tomado y modificado de Larson et al., 2016.

Actualmente se reconoce la existencia de cuatro subespecies, las cuales comparten ~97% de similitud génica, sin embargo, difieren en su grado de virulencia (Pechous, 2009). Las cuatro subespecies reconocidas son: *Francisella tularensis tularensis* (también conocida como tipo A), *Francisella tularensis holarctica* (también conocida como tipo B), las cuales pueden ser potencialmente mortales para el ser humano si no se diagnostican tempranamente (Sjöstedt, 2007). Por otro lado, se encuentran las subespecies: *Francisella tularensis mediasiatica* de virulencia moderada y *Francisella tularensis novicida* de baja virulencia (Johansson et al., 2004; Keim et al., 2007). Recientemente esta última por análisis de polimorfismo de un solo nucleótido del genoma completo, indica que probablemente es especie independiente (Keim et al., 2007).

2.2 Distribución Geográfica

Francisella tularensis está ampliamente distribuida en el Hemisferio Norte, con predominancia en Estados Unidos (Feldman et al., 2001; Hornick, 2001; Tularemia-United States 2002). Esta especie se encuentra en la mayor parte de los países europeos, China, Irán, Israel y Japón. En la antigua Unión Soviética existen extensas zonas con focos naturales (Eiros y Rodríguez, 1998). *Francisella tularensis tularensis* se ha registrado en varios estados de Estados Unidos de América: Nevada, Utah, Dakota del Norte y del Sur, Kansas, Oklahoma, Arkansas, Illinois y Missouri (Saliba et al., 1966; Titball y Sjöstedt, 2003). Por otro lado, *F. t. holarctica* comparte la distribución con *F. t. tularensis* en California. Arizona y Colorado, pero también se ha registrado en Oregón, Montana,

Indiana, Kentucky y Nueva York, así como en Alaska y en países de Europa y Asia [España, Portugal, Francia, Italia, Suiza, Rusia, Noruega, Suecia, Finlandia, Bulgaria, República Checa, Alemania, Kosovo, Turquía, Hungría, Eslovaquia, Austria, Estonia, Lituania, Rumania, Reino Unido y Japón] (Eliasson et al., 2000; Helvaci et al., 2000; Anda et al., 2001; Kantardjiev et al., 2006). Por otro lado *F. t. mediasiatica* y *F. t. novicida* (Johansson et al., 2004; Keim et al., 2007), la primera registrada en algunos estados de Asia [Kazakhstán y Uzbekistán] y la segunda en Australia, Tailandia y en estados de Norteamérica: Texas, Utah y Wyoming [Figura 3].

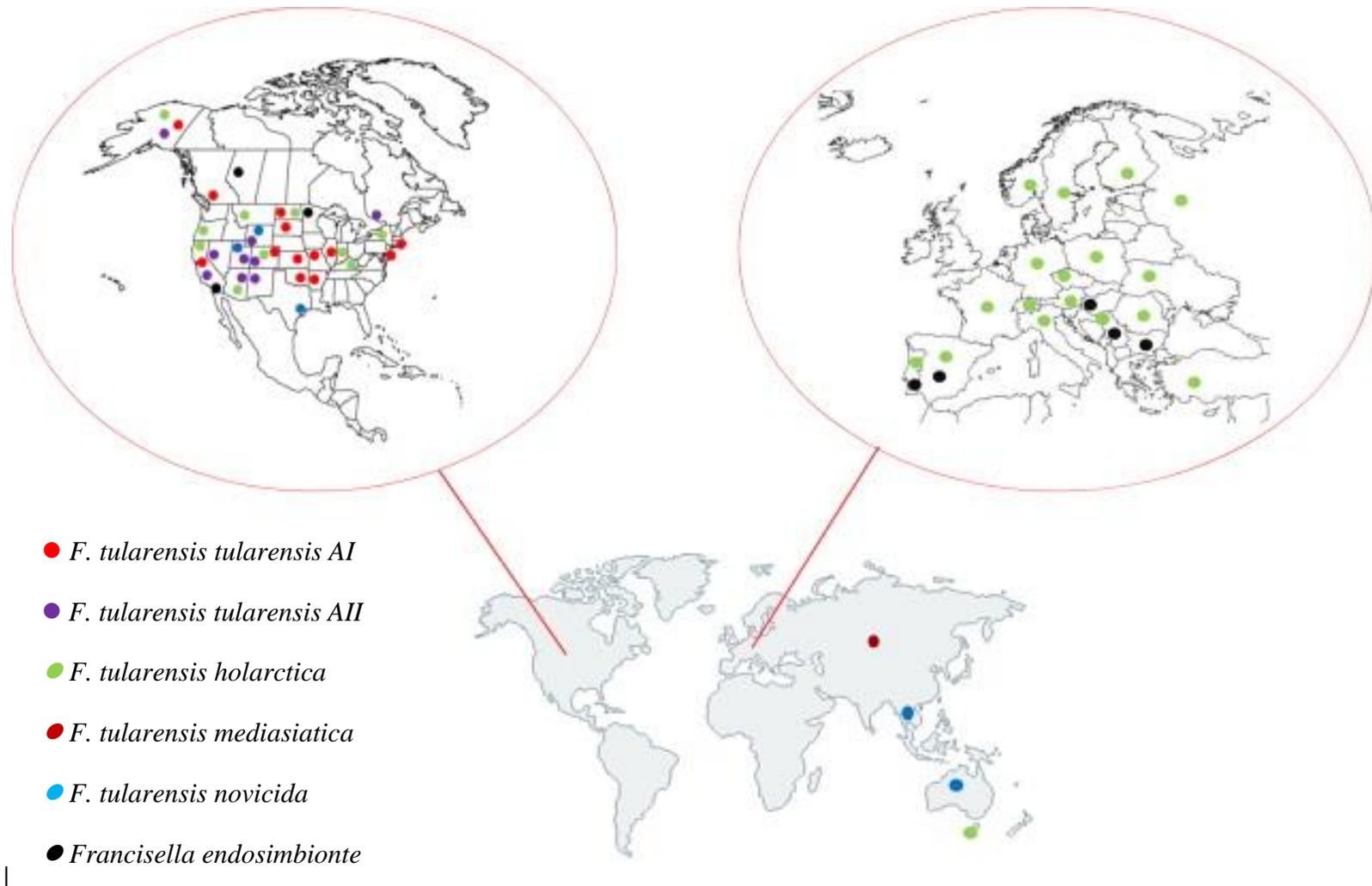


Figura 3.- Mapa de distribución de las subespecies de *Francisella tularensis* y *Francisella endosimbionte*. Tomado y modificado de Carvalho et al., 2014.

2.3 Agente etiológico

Francisella tularensis tularensis y *F. t. holarctica* son las subespecies asociadas con la Tularemia, una patología sistémica que afecta a los seres humanos. *Francisella tularensis tularensis*, presente principalmente en América del Norte es causante del 70 al 90% de los casos humanos en esa parte del mundo, seguida de *F. t. holarctica* (Sjosted et al., 1992). Esta última subespecie es la causa principal de la Tularemia en Europa (Oyston et al., 2004). En contraste *F. t. mediasiatica* y *F. t. novicida* raramente se asocian con casos humanos (Ellis et al., 2002; Oyston et al., 2004; Peterson y Schriefer, 2005).

2.4 Hospederos

En la naturaleza, *F. tularensis* se ha reportado en más de 100 especies de hospederos silvestres, incluyendo lagomorfos, roedores, carnívoros, ungulados, marsupiales, aves, peces, anfibios e invertebrados (Montejo et al., 1998). *Francisella tularensis tularensis* tipo A se asocia más comúnmente con lagomorfos (conejos y liebres) sobre todo con especies del género *Sylvilagus*, mientras que *F. t. holarctica* tipo B se asocia con mayor frecuencia con roedores (Hopla, 1974; Campana et al., 1977). En menor proporción se ha detectado *F. t. tularensis* en ardillas del género *Sciurus*, mapaches *Procyon lotor* y en *Felis silvestris* (Taylor et al., 1991).

2.5 Vectores

Francisella tularensis tiene una gama amplia de vectores capaces de diseminar la infección (Petersen y Schriefer et al., 2009). Los vectores de esta especie incluyen garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Ornithodoros*; mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* y *Ochlerotatus* y moscas de la familia Tabanidae (Ellis et al., 2002; WHO, 2007; Petersen y Schriefer et al., 2009; Lopes et al., 2009).

El vector de *F. tularensis* varía en función de la localización geográfica, pero por lo general se describen diversas especies de garrapatas (eg. *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus* y *Haemaphysalis concinna*), principalmente en países de Europa como Portugal, República Checa, Kosovo, Bulgaria, Alemania, España, Turquía, Francia y Noruega (Toledo et al., 2009; Franke et al., 2010; Gyuranecz et al., 2011). Por otro lado, en Suecia y Finlandia el vector principal son los tábanos (Edlow, 2008). En Estados Unidos se han reportado ambos grupos de artrópodos como vectores de *F. t. tularensis* (Carvalho et al., 2007).

Los vectores juegan un papel importante en el mantenimiento de la infección mediante la dispersión de *F. tularensis* dentro de la población de vertebrados, así como hacia el humano (Olsufiev et al., 1943). Por lo tanto, es sumamente importante considerar la ecología del vector que es determinada por múltiples factores bióticos y abióticos (e.g. ciclo de vida, temperatura, estacionalidad y distribución) dando lugar a la abundancia y diversidad de estos y sus hospederos involucrados en la historia natural de la enfermedad. Esto explica el por qué en los Estados Unidos, Suecia, Finlandia y Rusia, la picadura de artrópodos es un modo común de transmisión a los humanos, mientras que en Occidente y algunos países de

Europa Central, el contacto con animales infectados y la ingesta de alimentos o agua contaminados han sido reportados como modos de transmisión más comunes (*Petersen y Schriefer, 2009*). Esto se debe a que la circulación de la Tularemia no sólo se determina por la ecología del vector o del hospedero también es pertinente considerar las actividades humanas como un factor importante en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad.

2.6 Transmisión

Frnacisella tularensis puede infectar una amplia variedad de vertebrados e invertebrados, sin embargo, es propia de lagomorfos y pequeños roedores, ya que tienen un papel importante en el ciclo de vida como hospederos (*Morner, 1992*). En América del Norte los animales que con más frecuencia sirven de fuente de infección para el hombre son los conejos silvestres (*Sylvilagus spp.*), las liebres (*Lepus californicus*), los castores (*Castor canadensis*), las ratas almizcleras (*Ondatra zibethicus*), los ratones microtinios (*Microtus spp.*) y los ovinos. *F. t. tularensis* generalmente es transmitida por conejos silvestres o por sus garrapatas (*Dermacentor variabilis*, *Dermacentor. andersoni*, *Amblyomma americanum*). La vía de transmisión más importante es el contacto directo con un animal infectado; como puerta de entrada actúan generalmente las pequeñas heridas o erosiones originadas al manipular el animal. Otras posibilidades de transmisión son la ingestión de carne mal cocinada, de agua contaminada, la inhalación de partículas (especialmente importante en el empleo de la *F. tularensis* como arma biológica) y la picadura de artrópodos, sobre todo de garrapatas [Figura 4] (*Rodríguez, 1998; Senol et al., 1999; Eiros y Alkorta et al., 2000; Feldman et al., 2001; Tularemia-United States 2002*). La transmisión de humano a humano es muy poco frecuente (*Moran, et al. 2008*). Debido a estos patrones de transmisión, la Tularemia suele presentar una distribución bimodal: los casos derivados

del contacto con animales son más frecuentes en otoño e invierno, durante la temporada de caza, mientras que los ocasionados por picaduras de artrópodos son más frecuentes en primavera y verano, que es cuando las garrapatas muestran mayor actividad (Bachiller et al., 1998; Alkorta et al., 2000; Díaz de Tuesta et al., 2001).

2.7 Ciclo de vida de *Francisella tularensis*

Se reconocen dos ciclos de vida de la Tularemia, el terrestre y acuático (Akimana y Kway, 2011). En ambos casos el humano participa como hospedero accidental.

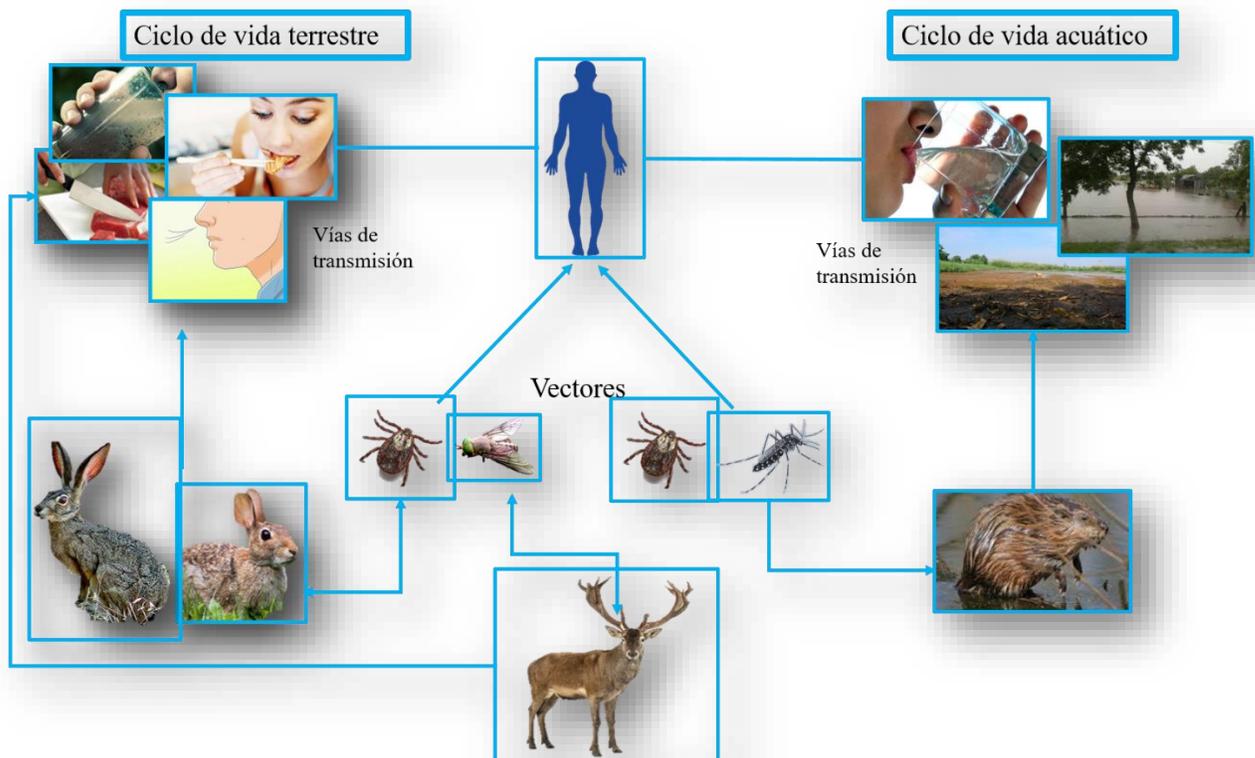


Figura 4.- Ciclo de vida de *Francisella tularensis*. Aquí se muestra que la bacteria puede circular en ambientes terrestres y acuáticos, además se puede encontrar en vida libre, ya que es intracelular facultativa.

2.8 Cuadro clínico

El periodo de incubación es de tres a seis días, aunque puede oscilar entre algunas horas y tres semanas. Las seis formas clínicas de la Tularemia son en función de la frecuencia con manifestaciones ulcero-ganglionares (75%), neumónicas (la más letal), tifoídicas, ganglionares puras, orofaríngeas y óculo-ganglionares [Cuadro 1] (Mattix et al., 2006). En todas sus formas, se instala de un modo brusco, con fiebre ondulante, escalofríos, astenia, dolores musculares y articulares, cefalalgia y vómitos. Es una enfermedad sistémica con sintomatología muy variable y difícil de diagnosticar (Acha, 2001).

Cuadro 1. Forma clínica, características y consecuencias de la Tularemia con base en la vía de entrada. (Instituto de Salud Carlos III, 1997; Montejo et al., 1998; Jacobs, 2001; Vega et al., 2003; Vincent et al., 2003; Eliasson et al., 2006; Lupi et al., 2006; Marty, 2006; Mattix et al., 2006; Nicolasora y Kaul, 2008).

Forma clínica	Vía de entrada	Características	Consecuencias
Ulceroglandular (úlceras cutáneas)	Por picadura de un artrópodo, rasguño con uñas contaminadas o cortaduras con cuchillo.	Se observa una lesión local en la vía de entrada que progresa hacia una ulceración necrotizante. El ganglio supura con frecuencia, se ulcera o se esclerosa.	En los casos no tratados, el curso de la enfermedad dura de tres a cinco semanas y la convalecencia, de varias semanas a meses, con algunos accesos febriles.
Glandular (Linfadenopatía regional sin úlcera)	No se observa la lesión primaria.	Es la más prevalente en el Japón. Es una variación de la ulceroglandular sin lesión.	Entre el 5 y 10% de los casos no se encuentra la puerta de entrada y se llega al diagnóstico tras el estudio de uno o varios ganglios linfáticos afectados.

Oculoglandular (Conjuntivitis con lifadenopatía preauricular)	Cuando material contaminado llega a la vía conjuntiva.	La lesión primaria se localiza en el párpado inferior y consiste en una pápula ulcerada, con tumefacción simultánea de los ganglios regionales	En ocasiones, úlceras corneales e incluso ceguera.
Neumónica (enfermedad pulmonar primaria)	Se presenta vía respiratoria	Se origina por aerosoles. Afecta a trabajadores rurales o de laboratorio, y produce una neumonía unilateral o bilateral.	La letalidad de las formas pulmonares es alta. Si no se trata a tiempo, el curso de esta forma clínica puede ser corto y mortal
Tifoídica (Enfermedad febril sin precoz localización de signos o síntomas)	Se produce por ingestión de alimentos contaminados.	Es poco común. Ingesta generalmente de carne de conejos silvestres infectados o de agua contaminada.	Si no se trata a tiempo, el curso de esta forma clínica puede ser corto y mortal.

3. Antecedentes

En 1653 se reportó en Noruega una enfermedad en poblaciones de lemmings similar a la Tularemia (Scheel et al., 1992). Casos humanos de esta enfermedad se informaron por primera vez de forma esporádica en los Estados Unidos, Europa y Japón durante el siglo XIX y principios del XX (Ohara, 1954; Morner, 1992).

Sin embargo, George McCoy y Charles Chapin (1912) en el Condado de Tulare, California aislaron por primera vez la bacteria causante de la Tularemia, que en ese tiempo se conocía como " Enfermedad similar a la peste de roedores" o *Bacterium tularense* (Mandell et al., 2005 y Oyston, 2008), la bacteria fue cultivada a partir de ardillas de tierra infectadas durante el brote generado en el Condado de Tulare (McCoy y Chapin, 1912), En 1914, Wherry y Lamb publicaron el primer caso en humanos (Wherry y Lamb, 1914). Sin

embargo, el pionero en el seguimiento de un brote de este patógeno (a quién se le debe el nombre) fue Edward Francis quién realizó en 1928 la investigación de más de 600 casos humanos (Francis, 1925 y 1928).

La Tularemia es una enfermedad que ha circulado dentro de la población de vertebrados desde su origen (Olsufiev et al., 1943); La bacteria se asocia principalmente a mamíferos pequeños, como es el caso de algunos lagomorfos especialmente en el género *Lepus*, en roedores de diversos géneros (e.g. *Ondatra*, *Microtus*, *Sciurus* y *Castor*) y en menor medida se ha registrado en el orden Carnívora particularmente en especies *Felis silvestris*, *Procyon lotor* y participando como hospedero accidental el humano [Cuadro 2]. En 1930 en Ohio, fueron verificados los primeros casos de la enfermedad en humanos. Posteriormente en Japón un cortador de carne de 21 años de edad buscó atención médica por una úlcera conjuntival y linfadenopatía, la investigación mostró que el agente de la enfermedad fue *F. tularensis* ((Wherry y Lamb, 1914; Ohara, 1925).

En 1982 Olsufjev y Meshcheryakova, fueron los primeros en clasificar a *F. tularensis* en tres subespecies. Más tarde, Keim (2007) introdujo una nueva clasificación, la cual integra a las 4 subespecies actuales.

La Tularemia fue eliminada de la lista de enfermedades de notificación nacional en Estados Unidos de América en 1994, pero aumentó la preocupación por el uso potencial de *F. tularensis* como arma biológica lo que condujo a su restablecimiento en el 2000. El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) reportó un gran número de casos de Tularemia durante 1990-2000, en Norteamérica y Europa

(Gurycova, 1998). En menor cantidad se han reportado casos en Asia y América Central [Cuadro 2].

Para México, la disponibilidad de información ha sido poco alentadora ya que durante la historia de la enfermedad los registros son escasos y existe poca información. Desde 1935 se ha sospechado la existencia de Tularemia en México. El primer caso reportado fue por el Dr. Raúl Tovar Mancera, quién en 1941, mediante procedimientos epidemiológicos y serológicos, estudió a más de 3 000 personas, encontrando 6% de anticuerpos positivos a la bacteria, incluso detectó a un enfermo del Estado de México, quien presentaba la forma clínica tifoídica. (Arenas, 2009).

Más tarde, se realizó la descripción clínica del primer caso de la variedad clásica (ganglionar) de la enfermedad por el maestro Fernando Latapí y Yolanda Ortiz, quienes encontraron una dermatosis que afectaba el borde radial del dedo índice derecho (Arenas, 2009) Sin embargo en ningún caso se mostró el modo de transmisión ni la subespecie de *F. tularensis* de la cual se trataba. Fue hasta 1992, que se realizó una búsqueda de varios patógenos en el Noroeste de México, principalmente en Coahuila y Nuevo León donde por pruebas serológicas se encontró *F. tularensis* en *Odocoileus virginianus* (Aguirre et al., 1992). Tristemente éste fue el último estudio que se realizó en México.

En México se concentra una gran diversidad de mamíferos pequeños entre ellos los roedores que ocupan cerca del 46% de especies, existiendo alrededor de 245 especies y 15 especies de lagomorfos (Ceballos, 2012). Gran número de roedores se encuentran distribuidos en la Faja Volcánica Transmexicana en bosques de coníferas y pastizales (León, 2014), siendo Hidalgo uno de los estados con mayor riqueza. El 30% de los

mamíferos del estado de Hidalgo son roedores (Mejenes et al., 2010) y con ellos vienen incluidos los vectores que permiten a *F. tularensis* completar su ciclo de vida.

Cuadro 2. Listado de las subespecies de *Francisella tularensis* registradas en México y el mundo. ND: no disponible.

Especie de patógeno (subespecies)	Modo de transmisión	Hospedero	Enfermedad	País o estado	Año	Referencia
<i>Francisella tularensis</i>	Artrópodos.	Lagomorfos, Roedores y peces	Tularemia	España, Portugal, Serbia, Hungría y Bulgaria	2014	(Carvalho, et al 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Contacto con tejidos de animales infectados, aerosoles, comida y agua contaminada. Artrópodos.	Roedores, liebres y humanos	Tularemia	República Checa	1936 y 2000	(Carvalho, et al 2014).
<i>Francisella tularensis</i>	Ingestión de agua y comida contaminada.	ND	Tularemia	Kosovo	1999-2000 y 2001 2002-2010	Carvalho, et al 2014).
<i>Francisella tularensis</i>	Ingestión de agua y comida contaminada.	Liebres	Tularemia	Bulgaria	1962, 1997, 2000-2005	(Carvalho et al., 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Contacto con tejidos de animales infectados.	Roedores y Liebres	Tularemia	Alemania	1949 y 2004-2005	(Carvalho et al., 2014)

<i>Francisella tularensis</i>	Contacto con tejidos de animales infectados, aerosoles (granjas).	ND	Tularemia	Suecia	1931 y 2000-2005.	(Carvalho et al., 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Mosquitos, aerosales (granja) y garrapatas	ND	Tularemia	Finlandia	2000, 2003, 2007	(Carvalho et al., 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Aerosales, lagomorfos, cánidos, roedores, ovejas, vectores hematófagos, cangrejo de río.	Liebres y humanos, posteriormente roedores	Tularemia	España	1997 y 2007	(Carvalho et al., 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Agua contaminada.	Pequeños mamíferos	Tularemia	Turquía	1936, 2000 y 2004-2010	(Carvalho et al., 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Contacto con tejidos de animales infectados, garrapatas.	Liebres	Tularemia	Francia	1997-2011	(Carvalho et al., 2014)
<i>Francisella tularensis</i>	Agua y comida contaminada	Roedores (lemmings) y liebres <i>Sylvilagus audubonii</i>	Tularemia	Noruega	2003, 2005, 2007 y 2011	(Carvalho et al., 2014)

<i>Francisella tularensis</i> , <i>F. holarctica</i> , <i>F. t. mediasiática</i> , <i>F. t. novicida</i> ,	Garrapatas, moscas	ND	Tularemia	ND	2009	(Foley et al., 2010)
<i>Francisella tularensis</i>	Garrapatas, moscas	América Microtus sp., ratones, Sciurus, <i>Ondatra zibethicus</i> , <i>Castor canadensis</i>	Tularemia	América del Norte, Europa y Asia	2015	(Johansson et al., 2015).
		Asia Lagomorfos, liebres, y conejos				
<i>Francisella tularensis</i> , <i>F. t. holarctica</i> , <i>F. hispaniensis</i> .	Garrapatas	Lagomorfos y pequeños mamíferos	Tularemia	Península Ibérica y Portugal	2016	(Carvalho et al., 2016)
<i>Francisella tularensis</i>	ND	Liebres, ardillas terrestres	Tularemia	Condado Tulare	2008	(Nigrovic et al., 2008).
<i>Francisella tularensis</i>	ND	<i>Odocoileus virginianus</i>	Tularemia	Noroeste de México: Coahuila Nuevo León	1992	Aguirre et al., 1992).
		<i>Lepus californicus</i> <i>Mephitis mephitis</i>		Nueva Jersey		

<i>Francisella tularensis</i>	ND	Humano	Tularemia	Estado de México	1941	(Arenas et al., 2009)
<i>Francisella tularensis</i>	ND	Humano	Tularemia	Michoacán	1935	(Arenas et al., 2009)
<i>Francisella tularensis tularensis</i>	Garrapata	Gatos Conejos Humanos	Tularemia	Nebraska	2014	(Larson et al., 2014).
<i>Francisella tularensis</i>	Garrapata	Humanos Conejos Ardillas Gatos Mapaches	Tularemia	Arkansas, Kansas, Louisiana, Missouri, Oklahoma y Texas	1981- 1987	(Taylor et al., 1991).
<i>Francisella</i>	Garrapata	Conejos	Tularemia	Gran Lago Salado Ciudad de Brigham (Utah) Tremonton (Utah)	1910- 1935	(Hillman y Morgan 1937) .
<i>Francisella</i>	ND	Mamíferos Aves Reptiles Peces	Tularemia	ND	2005	(Sjöstedt et al., 2005).
<i>Francisella tularensis tularensis AI</i>	<i>Amblyomma americanum</i> y <i>Dermacentor variabilis</i>	Conejo <i>Sylvilagus floridanus</i>	Tularemia	Alaska Columbia Británica California	1995	(Farlow et al., 2005).
<i>Francisella tularensis AII</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> y <i>C. discalis</i>	Conejo <i>Sylvilagus nuttali</i>		Oeste de Estados Unidos Ontario		

				Texas		
--	--	--	--	-------	--	--

4. Hipótesis

Dado que existe evidencia serológica de *F. tularensis* en fauna silvestre en México y se han registrado diversas especies de roedores y garrapatas reservorios de la bacteria en el estado de Hidalgo, este patógeno se encuentra circulando en poblaciones de mamíferos pequeños en el estado de Hidalgo, México.

5 Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es identificar la presencia de *F. tularensis*. en muestras de hígado de mamíferos pequeños recolectados en el estado de Hidalgo, México.

5.1 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para la detección de *F. tularensis* mediante el uso de los oligonucleótidos TUL4-435 y TUL4-863.
- Analizar las muestras de hígado y bazo de mamíferos pequeños recolectados mediante el uso de la técnica PCR,
- Identificar las subespecies de *F. t. tularensis* presente en los ejemplares recolectados, mediante la secuenciación del gen *17 kDa*.

- Determinar la prevalencia de *F. tularensis* en las especies de mamíferos pequeños recolectados.

6. Material y Métodos

6.1 Trabajo de campo

6.1.1 Área de estudio

Las muestras se recolectaron en dos localidades del suroeste del estado de Hidalgo, México. La primera fue el Rancho Santa Elena, en el Municipio de Huasca de Ocampo, (20° 12' 8''N, 98° 30' 55'' O) a una altitud de 1,800-2,800 metros sobre el nivel del mar (msnm). El municipio colinda al norte con Veracruz y al sur con los municipios de Tulancingo y Omitlán de Juárez, Hidalgo. La vegetación predominante es el bosque de pino-encino, presenta periodos de sequía y humedad.

El segundo sitio fue el Rancho Cruxtitla, en el Municipio de Mineral del Monte (20° 08' N, 98° 40' O) con una altitud de 2,417 msnm el cual colinda al norte con los municipios de Mineral del Chico y Omitlán de Juárez, Hidalgo. El tipo de clima es frío y llueve con frecuencia. La vegetación predominante es el bosque de pino, es un área perturbada principalmente por el ejercicio de actividades agrícolas, ganaderas y por la industria forestal (Mineral del Monte, 2012).

6.1.2 Colecta de hospederos

Los mamíferos pequeños se recolectaron durante el mes de agosto y septiembre del 2015 se colocaron respectivamente tres transectos separados entre sí por 5m con 40 trampas

Sherman separadas entre sí por un metro, durante tres noches completas. Se utilizó una mezcla de avena con vainilla como cebo, Cada mañana las trampas fueron revisadas y los ejemplares recuperados fueron introducidos de manera individual en una bolsa.

6.1.3 Extracción y preservación de órganos

Posteriormente, los organismos recolectados fueron sacrificados acorde con los procedimientos para el trabajo y experimentación de mamíferos silvestres (Ganos y Sikes 2007). Se les realizó una disección ventral para llevar a cabo la extracción de los órganos, principalmente de hígado y bazo, los cuales fueron fijados en etanol al 96%, posteriormente se rotuló cada muestra con fecha y localidad. Para cada extracción se esterilizó el material en alcohol al 90% con el fin de evitar la contaminación entre los distintos órganos. Finalmente, las muestras se guardaron a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

6.1.4 Identificación de mamíferos pequeños

Los mamíferos colectados fueron identificados mediante el uso de literatura especializada y posteriormente se taxidermizaron y depositaron en el Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias de la UNAM en el catálogo LRR del 1-41.

6.2 Trabajo de Laboratorio

6.2.1 Extracción de DNA de tejidos

Para la extracción de DNA a partir de muestras de hígado, se retiró el alcohol utilizado para preservar las muestras y se utilizó el Kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, US.), se siguió el manual de procedimiento [Anexo 1].

6.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó el gen *17-kDa* que codifica para una lipoproteína de 400pb. para amplificar *Francisella* sp. [Cuadro 3]. La mezcla consistió en 2 µl de DNA, 12.5 µl de GoTaq® Green Mix Master (Promega), 1 µl de cada oligonucleótido en una concentración de 2µM (cada uno) y 8.5 µl de agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 µl. El control positivo fue DNA de *Francisella*-like proveniente de una garrapata (*Amblyomma dissimile*) donado por el Centro de Medicina Tropical, en la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. El control negativo fue la mezcla de reacción con agua libre de nucleasas.

Cuadro 3. Oligonucleótidos propuestos por Sjöstedt 1997

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
TUL4-435 (Forward)	5'-GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTC-3'
TUL4-863 (Reverse)	5'-TTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT-3'

Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un termociclador mediante el siguiente programa: una temperatura de desnaturalización inicial a 94°C por dos minutos, seguida de 1.30 minutos a 94°C, 1 minuto a 65°C y 1.35 minutos a 72°C por 35 ciclos, con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

$$95^{\circ}\text{C}-2' \left[\begin{array}{c} 94^{\circ}\text{C}-1.5' \\ 65^{\circ}\text{C}-1' \\ 72^{\circ}\text{C}-1.35' \end{array} \right] 35x \\ 72^{\circ}\text{C}-5'$$

Los productos de PCR obtenidos fueron almacenados a -20°C.

6.2.3 *Electroforesis*

Los productos obtenidos mediante PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, Para identificar muestras positivas, se comprobaron los tamaños de los fragmentos amplificados comparando con un marcador de peso molecular en una foto documentador ODYSSEY CLx Imaging System (LI-COR Biosciences).

6.2.4 *Secuenciación*

Las muestras positivas fueron secuenciadas en el Laboratorio de Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

6.2.5 *Análisis de datos*

Las secuencias se sometieron a alineamientos locales mediante el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool [BLAST] (Altschul et al., 1990; Benson et al., 2005). Para corroborar la identidad de las secuencias recuperadas y las depositadas en GenBank, se obtuvieron secuencias de las cuatro subespecies de *F. tularensis* presentes en el mundo y se incluyó a *Francisella persica* como grupo externo. Para ello se realizó un alineamiento global mediante Clustal W en MEGA 6 (Tamura 2013). Se seleccionó el mejor modelo de sustitución mediante el criterio de BIC (Bayesian Information Criterion).

Posteriormente se realizaron dos análisis de inferencia filogenética mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud y un análisis fenético: Neighbor Joining en MEGA 6 y el soporte de las ramas se evaluó utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos de tres parámetros Tamura (T92), evaluando el soporte de los clados mediante 10,000 réplicas [Bootstrap] (Page et al., 2004).

6.2.6 Distribución geográfica

Para conocer si se presentaron nuevos registros para México de *F. tukarensis*, se realizó una revisión bibliográfica en bases de datos especializadas (BioOne, Elsevier y Scopus). Las localidades obtenidas fueron georeferenciadas con ayuda de la herramienta de Geolocalización de Google Maps y se generó un mapa de distribución de las subespecies de *Francisella tularensis* registradas entre 1931 y 2016 con ayuda del software QGis.

7. Resultados

Colecta de hospederos

En el presente trabajo se recolectaron 41 mamíferos de cinco especies (26 *Peromyscus beatae*, 2 *Reithrodontomys sumichrasti*, 8 *Mus musculus*, 4 *Rattus norvegicus* y 1 *Sorex ventralis*) en dos localidades [Figura 5]. En la primera localidad (Rancho Santa Elena) se recolectaron 23 organismos en total de los cuales 20 individuos fueron pertenecientes a la Familia Cricetidae de la especie *Peromyscus beatae*. Por otro lado, en la segunda localidad (Rancho Cruxtitla) se recolectaron 18 individuos con mayor número de individuos pertenecientes a la Familia Muridae de la especie *Mus musculus* [Cuadro 4].

Se obtuvieron dos individuos positivos [Figura 6] los cuales pertenecen a la especie *Peromyscus beatae* colectados en la primera localidad con una prevalencia local de 10% (2/20) y una prevalencia global de 7.7% (2/26) [Cuadro 5]

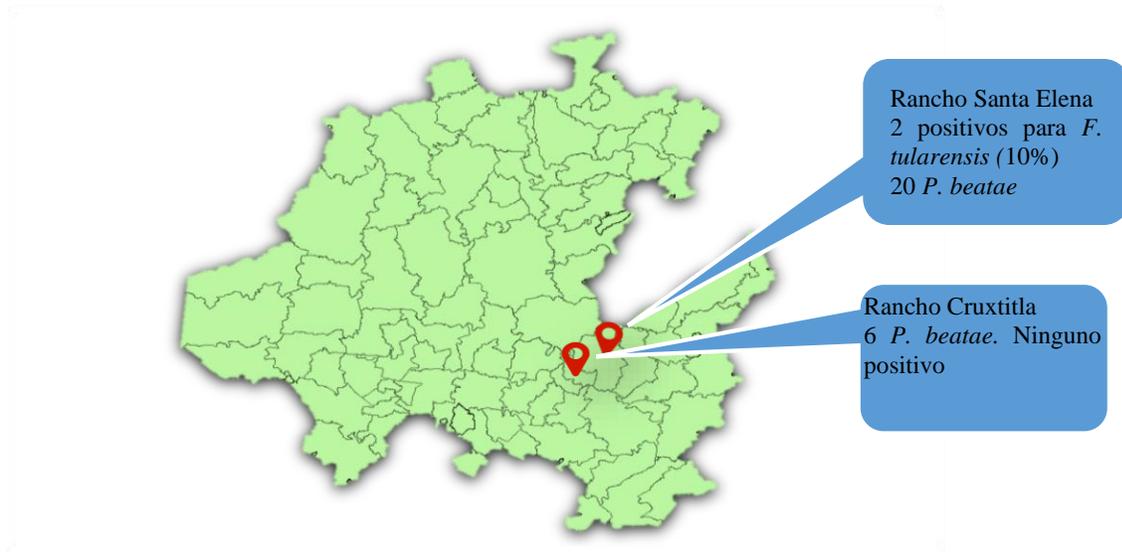


Figura 5. Mapa con las dos localidades de Hidalgo, positivos para *F. tularensis*. y su prevalencia local para Rancho Santa Elena.

Cuadro 4. Mamíferos colectados en dos localidades de Hidalgo, México

Colecta de mamíferos			
Localidad	Familia	Especie	No. de individuos
Rancho Santa Elena	Cricetidae	<i>Peromyscus beatae</i>	20
		<i>Reithrodontomys sumichrasti</i>	2
	Soricidae	<i>Sorex ventralis</i>	1
	Total de individuos		23
Rancho Cruxtitla	Cricetidae	<i>Rattus norvegicus</i>	4
		<i>Peromyscus beatae</i>	6
	Muridae	<i>Mus musculus</i>	8
		Total de individuos	

Cuadro 5.- Prevalencia de *Francisella tularensis* en mamíferos pequeños de Hidalgo, México

Hospederos					
Familia	Especie	Hc	Hi	% global	ABD
Cricetidae	<i>Peromyscus beatae</i>	26	2	7.7	<i>Francisella tularensis</i>
	<i>Reithrodontomys sumichrasti</i>	2	ND	0	ND
Muridae	<i>Mus musculus</i>	8	ND	0	ND
	<i>Rattus norvegicus</i>	4	ND	0	ND
Soricidae	<i>Sorex ventralis</i>	1	ND	0	ND

Hc: Hospederos colectados; Hi: Hospederos Infectados; ND: No detectado; %; Prevalencia; ABD: Agente bacteriano detectado.

PCR

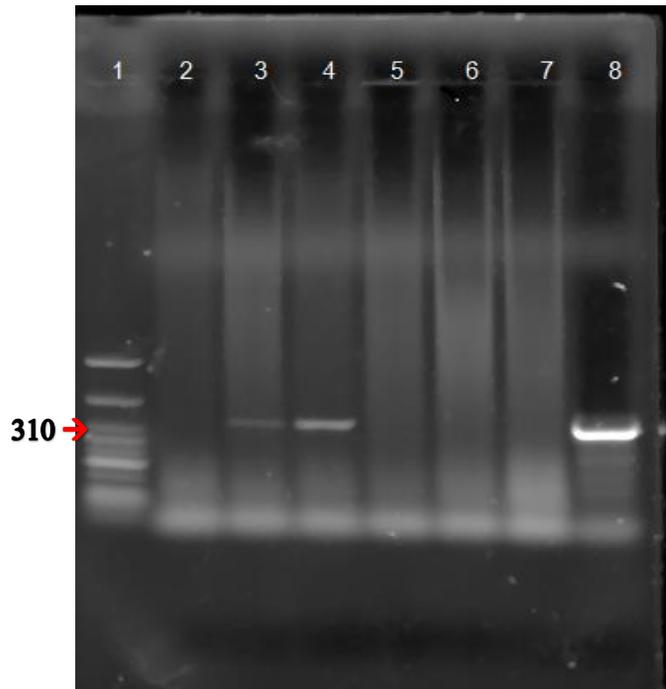


Figura 6.- Electroforesis de los productos de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular Φ X174. Carril 2-7: Muestras procesadas. Carril 8: Control positivo de *Francisella* sp. de *Amblyomma dissimile*. Las muestras 3 y 4 son positivas a DNA de *Francisella* sp.

Análisis de datos

Blast

El Blast dio como resultado que las secuencias positivas provenientes *Peromyscus beatae* de tienen un 99% de similitud con *F. t. holarctica* [Cuadro 6].

Cuadro 6. Resultados de Blast con la primer secun

Blast de la secuencia positiva de <i>F. tularensis</i>.	
Número de acceso de GenBank	MG432692.1
Número de nucleótidos que empatan con la secuencia positiva	198/201
Porcentaje de identidad con <i>F. t. holarctica</i>	99%

Análisis de Inferencia Filogenética y Análisis Fenético

Tanto el análisis de Máxima Verosimilitud [Figura 6], como el de Neighbor Joining [Anexo III] revelo que existen cuatro grupos genéticos, el primer grupo está constituido por las 6 secuencias provenientes de *F. t. holarctica* y por las secuencias positivas provenientes de *Peromyscus beatae*, en el segundo grupo se encuentran las secuencias provenientes de *F. t. novicida* y en el tercer grupo se encuentra una secuencia proveniente de la especie *F. tularensis*, una de *F. t. mediasiatica* y una de *F. t. tularensis* y en el último grupo se encuentra la secuencia de *F. persica*, la cual se consideró como el grupo externo.

Mapa de Distribución geográfica

Se generó un mapa con Qgis utilizando los diferentes registros de las subespecies de *F. tularensis* en México y el mundo [Figura 7], el cual nos brinda un panorama actual de la distribución de las subespecies de *F. tularensis*, adicionalmente se observa que la mayoría de las subespecies se encuentran principalmente en el Hemisferio Norte. Para México se tienen dos registros previos, en los cuales no se identificó la subespecie a la cual pertenece, y un registro actual perteneciente al estado de Hidalgo, en el cual se identificó que la subespecie est muy cercana a *F. t. holarctica*.

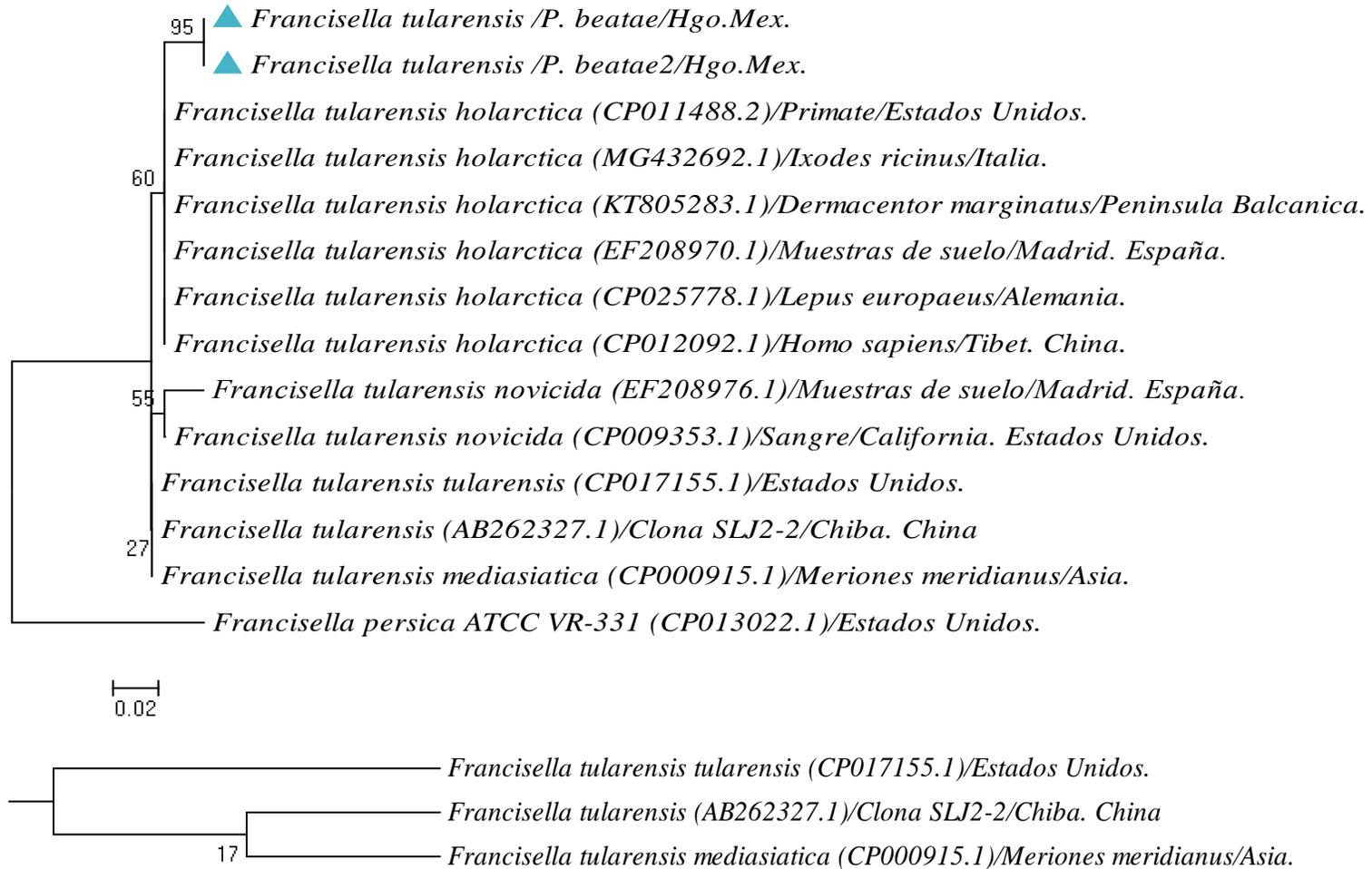


Figura 6.- Árbol filogenético de Máxima verosimilitud (ML) generado con el gen 17 kDa de varios miembros de la especie *F. tularensis*. El modelo de sustitución de nucleótidos fue el Modelo de tres parámetros Tamura (T92) los valores de Bootstrap superiores a 50 se indican en los nodos.

Mapa de distribución geográfica con base en los registros de las subespecies de *Francisella tularensis* de 1931-2016.

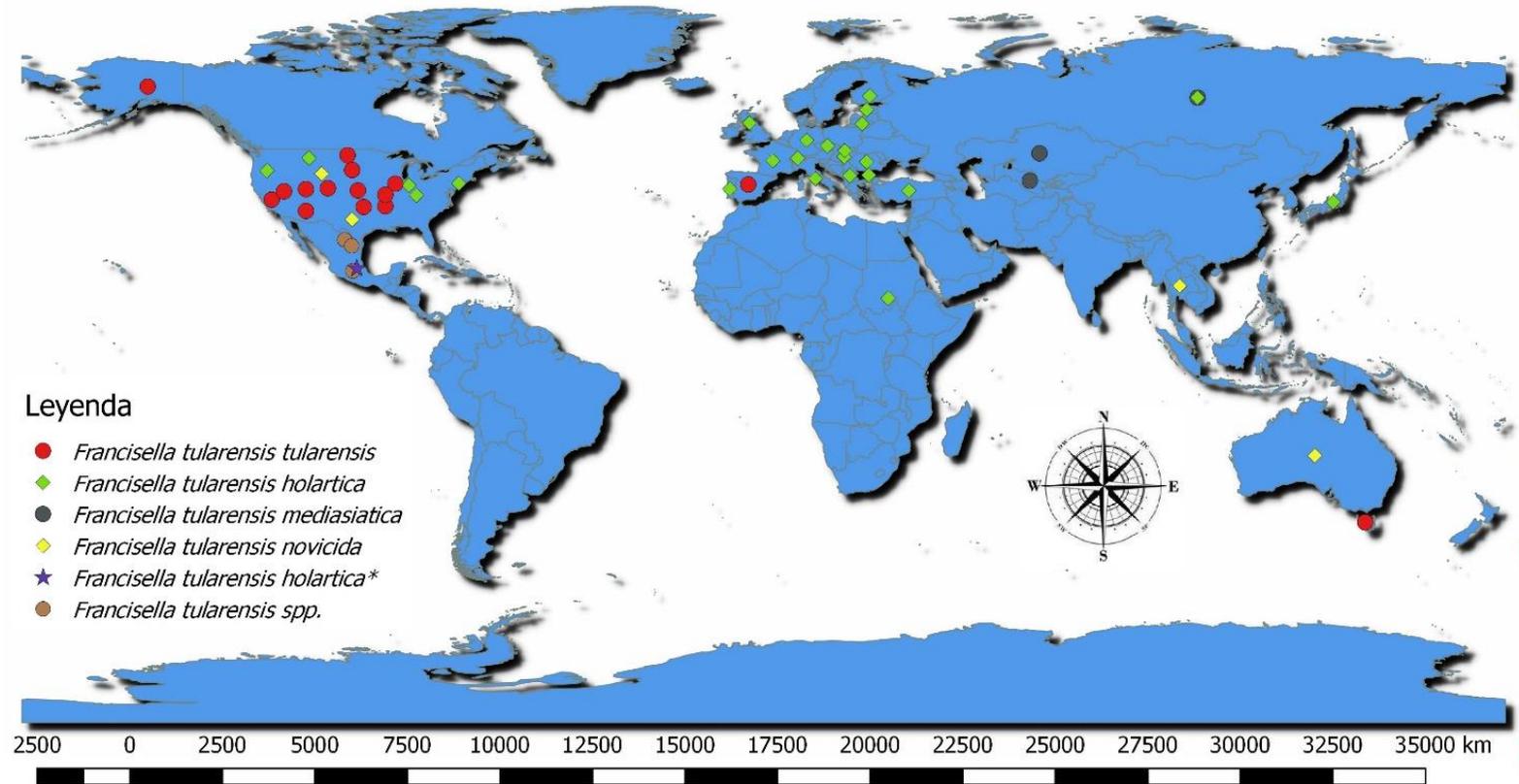


Figura 7.- Distribución geográfica de las especies de *F. tularensis* a partir de los registros de 1931-2016. ● *F. t. tularensis* que se distribuye en Alaska, gran parte de Norteamérica, Tasmania y España. ● *F. t. holarctica* que se distribuye en gran parte de Europa, Sudán, Rusia y Japón. ● *F. t. mediasiatica* distribuida en Kazakhsan, Uzbekistan y Rusia. ● *F. t. novicida* distribuida en Australia, Tailandia y algunos sitios de Norteamérica. ● *F. tularensis spp.*, estos registros datan de los años 1941 en Estado de México y 1992 en los estados de Nuevo León y Coahuila, realizados mediante pruebas serológicas, sin embargo, no se conoce la subespecie de *F. tularensis* a la que pertenecen. Por último, con una estrella ★ aparece el primer registro para el estado de Hidalgo de *F. tularensis* muy cercana a *F. t. holarctica* lo que demuestra que la bacteria sigue circulando en México.

8. Discusión

La Tularemia es considerada una zoonosis desatendida de la que se tiene pocos registros y no existe información actualizada, sin embargo, este trabajo es pionero en la detección de *F. tularensis* emparentada con un linaje patógeno *F. t. holarctica*, subespecie que después de *F. t. tularensis*, es la causante de aproximadamente el 70% de los casos humanos. Ya que este es el primer trabajo en donde se identifica *F. tularensis* cercana *F. t. holarctica*, la cual se registra por primera vez en poblaciones silvestres en el estado de Hidalgo. Lo cual no resulta raro puesto que se tienen registros de esta subespecie en países cercanos a México como Estados Unidos, por estas razones es de gran importancia conocer el ciclo de vida de *F. tularensis*, ya que México tiene un ecosistema potencial para que se establezca la bacteria principalmente por que cuenta con un impresionante número de mamíferos entre los que destacan roedores (alrededor de 325 especies) como; ardillas, ratas almizcleras, topillos, algunos lagomorfos, venados y caballos que juegan un papel relevante como hospederos (Ceballos, 2014) y en algunos casos como reservorios de la bacteria, aunado al hecho de que se tiene reporte de 68 especies de garrapatas de la familia Ixodidae (Guzmán-Cornejo et al. 2007; Guzmán-Cornejo y Robbins, Pérez et al. 2014), 225 especies de mosquitos de la familia Culicidae (Darsie et al. 1996) y 207 miembros de la familia Tabanidae (Manrique-Saide et al. 2012). Es la primera vez que se registra la bacteria en roedores de la especie *P. beatae*. lo cual concuerda con Hopla (1974) y Campana et al. (1977) los cuales mencionan que *F. t. holarctica* está asociada a roedores, esto es de gran interés ya que forma parte de la Familia Cricetidae que cuenta con una amplia distribución y que tiene la posibilidad de habitar zonas conservadas y perturbadas, por lo tanto, es de importancia médico-veterinaria ya que, si se rompe el equilibrio en la población en este

caso de *P. beatae*, es posible que la población humana se vea afectada. *P. beatae* puede llegar a ser intradomiciliario lo que resalta su potencial como transmisor directo de la Tularemia o indirecto si nos referimos a los ectoparásitos asociados a este roedor que participan como vectores en el ciclo de vida de la bacteria, ya que sus principales vectores son las garrapatas que a pesar de que no existen registros de garrapatas asociadas a *P. beatae*, se han encontrado garrapatas de los géneros Ixodes y Dermacentor, en otras especies de *Peromyscus* (Gúzman-Cornejo et al., 2007 y 2016).

Por otro lado los individuos positivos se encontraron en el Rancho Santa Elena el cual es un lugar conservado, por lo que existen dos posibles explicaciones para este resultado, la primera es que algún factor que mantenga en equilibrio el ciclo de vida de la bacteria y de esta forma *P. beatae* funge el papel de reservorio de la enfermedad y la segunda explicación podría ser que al ser un roedor común y que *F. tularensis* cumple con las características de tener una virulencia elevada por lo tanto su infectividad es baja, el cual podría ser un motivo de la baja prevalencia local (10%) lo que significa que no deberían existir tantos individuos infectados sólo los más susceptibles, de ser así *P. beatae* no sería reservorio de esta enfermedad, con lo cual la implicación en la salud no solo humana sino también de animales silvestres y domésticos, ya que esta bacteria se puede diseminar mediante el agua, aire y por ingesta (Rodríguez, 1998; Senol et al., 1999; Eiros y Alkorta et al., 2000; Feldman et al., 2001; Tularemia-United States 2002).

Tanto los análisis Filogenéticos cómo el análisis Fenético muestra una cercanía de las secuencias positivas con las subespecies *F. t. holarctica*, sin embargo, a pesar de que se encuentran dentro del clado de la subespecie antes mencionada, al tener ramas largas en el análisis de Máxima Verosimilitud, habla de que la subespecie encontrada en este estudio en

el estado de Hidalgo varía genéticamente con las subespecies de *F. t. holarctica* identificadas en otras partes del mundo. Esto nos indica que a pesar de que tienen un 99% de similitud existen variaciones dentro de las mismas subespecies.

Las zoonosis entran en el grupo de las enfermedades olvidadas o enfermedades desatendidas (Garza, 2007), características de zonas marginadas y producto de miles de muertos y enfermos al año (Gil y Samartino, 2013). Particularmente se habla de cuadros clínicos con fiebres de origen desconocido, esto nos demuestra la escasa información y la nula vigilancia epidemiológica con la que contamos, razón del gran sesgo que se tiene sobre los agentes etiológicos que circulan en México. Este estudio es un primer acercamiento para entender la distribución y la ecología de *F. tularensis*, ya que se debe considerar a la Tularemia como posible causante en los casos de fiebre de origen desconocido, de ser así es importante la identificación de las subespecies que circulan en México, sin embargo esto es difícil ya que es una bacteria de alto riesgo que requieren de laboratorios con nivel de bioseguridad III, diagnósticos de excelencia, personal altamente calificado, estándares y tecnología avanzada. Esto unido con los pocos recursos financieros, humanos y de materiales que son otorgados para la salud pública, se vuelve una idea prácticamente inalcanzable. Sin embargo, eso no es un impedimento para prevenir y controlar estas enfermedades.

Es necesario realizar más esfuerzo de muestreo para detectar el responsable de la transmisión de la Tularemia, tomando en cuenta que *F. t. holarctica* es potencialmente mortal si no se detecta a tiempo (Sjöstedt, 2007) [UdMO1] y debe ser de notificación primaria ya que su tasa de mortalidad es elevada y al primer indicio de su presencia es imprescindible la toma de decisiones para su control. Los hallazgos de este microorganismo

en poblaciones de roedores mexicanos deben tomarse en cuenta para establecer programas de prevención y monitoreo de un patógeno zoonótico en fauna silvestre en las zonas vulnerables.

9. Conclusiones

- Primer registro de *Francisella tularensis* muy cercana a la subespecie *holarctica* en México.
- Primer registro de *Francisella tularensis* muy cercana a la subespecie *holarctica* en mamíferos pequeños de Hidalgo, México.
- Se registra por primera vez la presencia de *F. t. holarctica* en muestras de *Peromyscus beatae*.

10. Referencias.

- Acha PN. (1986). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** OPS. 185-190.
- Acha PN, Szyfres Boris. (2001). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.** Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
- Aguirre Alonso A, McLean Robert G. Cook Robert S. (1992). **Short Communications, Serologic Survey for Selected Arboviruses and other Potential Pathogens in Wildlife from México.**
- Akimana C, Kway YA. (2011). **Francisella-arthropod vector interaction and its role in patho-adaptation to infect mammals.** Front Microbiol; 2:34.
- Alkorta N, Aguirrebengoa K, Pérez-Irezábal J, Ibarra S, Montejo M. (2000). **Tularemia adquirida por picadura de garrapata en Castilla-León.** Rev Clin Esp200:82-3.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). **Basic local alignment search tool.** Journal of Molecular Biology 215: 403-410.
- Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. (2005). **Mus musculus. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales.** Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. (2005). **Rattus norvegicus. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales.** Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Anda, P., Segura del Pozo, J., Diaz Garcia, J.M., Escudero, R., Javier Garcia Pena, F., Lopez Velasco, M.C., Sellek, R.E., Jimenez Chillaron, M.R., Sanchez Serrano, L.P., Martinez Navarro, J.F. (2001). **Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing.** Emerg. Infect. Dis.7, 575–582.
- Anuario Estadístico Hidalgo Edición (2000) [Gobierno del Estado de Hidalgo (Secretaría de Desarrollo Social) – INEGI].
- Arenas R. **“Tularemia. 1er. caso ulceroganglionar en México”.** En Fernando Latapí, 2009. **Sus contribuciones a la dermatología.** 1ª ed. México, Editores de Textos Mexicanos. 110-116

- Bachiller P, Pérez Castrillon JL, Martín Luquero M, Mena FJ, De La Lama J, Pérez Pascual P. (1998). **Descripción preliminar de un brote epidémico de tularemia en Valladolid.** Rev Clin Esp ;198: 789-93
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. (2005). **GenBank.** Nucleic Acids Research 33: D34-38.
- Bush AO, Lafferty KD y Lotz JM. (1997). **Parasitology meets ecology on its own terms.** Journal of Parasitology 83: 575-583.
- Campana JF. (1977). **Tularemia, CRC Handbook Series en zoonosis.** CRC Press; Boca Raton. pp 161-193. Sección a.
- Carvalho, I.L., Escudero, R., Garcia-Amil, C., Falcão, H., Anda, P., Nuncio, M.S. (2007). **Francisella tularensis,** Portugal. Emerg. Infect. Dis. 13, 666–667.
- Carvalho, C.L., Carvalho I.L, Zé-Zé L., Nuncio- M.S., Duarte E.L. (2014), **Tularaemia: A challenging zoonosis.** Portugal, Elsevier, 85-96.
- Carvalho, I.L., Toledo, A., Carvalho CL., Barandika JF., Respicio-Kingry, García CA., García AL., Olmeda AS., Zé-Zé L., Petersen JM, Anda P., Nuncio M.S., Escudero R. (2016). **Francisella species in ticks and animals, Iberian Peninsula; Tick and Tick-bone-Diseases.** 7 pág: 159-165
- Ceballos, G. y J. Arroyo Cabrales. (2012). **“Lista actualizada de los mamíferos de México 2012”**, Revista Mexicana de Mastozoología 2: 27-80.
- Ceballos, G. (2014). **Mammals of Mexico,** Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 974 pp.
- Cowley SC, Elkins KL. (2011). **Immunity to Francisella.** Front Microbiol ;2:26.
- Darsie RF Jr. **A survey and bibliography of the mosquito fauna of Mexico,** (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Control Assoc. 1996 Jun;12(2 Pt 1):298-306.
- Díaz de Tuesta AM, Chow-Quan, Geijo MP, Dimas J, Díaz de Tuesta FJ, Herranz CR, Val Pérez E. (2001). **Brote epidémico de tularemia en la provincia de Cuenca en relación con la manipulación de cangrejos.** Rev Clin Esp; 201:385-9.
- Dumler J. S., Barbet A. F., Bekker C. P., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. C., Rikihisa Y., Rurangirwa F. R. (2001). **Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and**

designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila Int J Syst Evol Microbiol 51 2145–2165

- Eiros JM, Rodríguez Torres A. (1998). **Tularemia**. Rev Clin Esp; 198:785-8.
- Eliasson H, Broman T, Forsman M. (2006). **“Tularemia: Current epidemiology and disease management”**. Infect Dis Clin North Am; 20: 289-311.
- Ellis J., Oyston PC., Green M. y Titball R.W. 2002. **La Tularemia**. Clin. Microbiol. Rev. 15 : 631-646.
- Edlow J. (2008). **“Preface: Tick borne diseases”**. Infect Dis Clin North Am; 22: xiii-xv
- Farlow J, Wagner DM, Dukerich M, Stanley M, Chu M, Kubota K, Petersen J, Keim P. (2005). **Emerg Infect Dis.**, Dec;11(12):1835-41.
- Feldman KA, Ensore RE, Lathrop SL, Matyas BT, McGuill M, Schriefer ME. (2001). **An outbreak of primar y pneumonic tularemia on Martha’s Vineyard**. N Engl Med; 345:1601-6.
- Forsman M., Sandström G., Sjöstedt A. (1994). **Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of Francisella strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR** Int J Syst Bacteriol 44 38–46
- Francis E. (1925). **Tularemia**. JAMA; 84:1243–50
- Francis E. (1925). **A summary of the present knowledge of tularemia**. Medicine (Baltimore) 1928;7: 411–32.
- Franke, J., Fritsch, J., Tomaso, H., Straube, E., Dorn, W., Hildebrandt, A. (2010). **Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany**. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6829–6836.
- Foley JE, Nieto NC. (2010). **Tularemia**. Vet Microbiol;140(3–4):332–8.
- Gannon WL y RS Sikes. (2007). **Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research** Journal of Mammalogy 88(3):809-823.
- Garza J. (2007). **Bioética en la educación veterinaria**. Ciencia Veterinaria.; 10:1-41
- Gil, A. D. y Samartino, L. (2013). **Zoonosis en los sistemas de producción animal en las 2. áreas urbanas y periurbanas de América Latina**. Food and Agriculture

Organization Ed. 2000. Disponible en:
<http://www.bvsde.paho.org/bvsea/fulltext/gil.pdf> (12 de agosto de 2013)

Gurycova D. (1998). **First isolation of Francisella tularensis subsp. tularensis in Europe.** Eur J Epidemiol;14(8):797–802.

Gyuranecz, M., Rigó, K., Dán, A., Földvári, G., Makrai, L., Dénes, B., Fodor, L., Majoros, G., Tirják, L., Erdélyi, K. (2011). **Investigation of the ecology of Francisella tularensis during an inter-epizootic period.** Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 1031–1035.

Guzmán-Cornejo C, Robbins RG, Pérez TM. (2007). **The Ixodes (Acari: Ixodidae) of Mexico: parasite-host and host-parasite checklist.** Zootaxa 1553: 47–58

Guzmán-Cornejo C, Robbins RG, Guglielmone AA, Montiel-Parra G, Rivas G, Pérez TM (2016) **The Dermacentor (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records.** ZooKeys 569:1–22. doi: 10.3897/zookeys.569.7221

Helvacı, S., Gedikoglu, S., Akalin, H., Oral, H.B. (2000). **Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years.** Eur. J. Epidemiol. 16, 271–276.

Hillman CC, Morgan MT. (1937). **Tularemia-Informe de una epidemia fulminante transmitida por la mosca de ciervo.** JAMA. 108: 538 - 40.

Hopla CE. (1974). **La ecología de la tularemia.** Adv. Veterinario. Sci. Comp. Medicina; 18

Hornick R. (2001). **Tularemia revisited.** N Engl J Med; 345: 1637-9.

Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (1997). Boletín Epidemiológico Semanal;5,26:249-56.

Jacobs RF. (2001). **Tularemia. En Harrison. Principios de Medicina Interna.** 15.^a edición en español. Madrid: McGray-Hill-Interamericana de España; vol. I pág. 1169-1173.

Johansson A, Farlow J, Larsson P, Dukerich M, Chambers E, Bystrom M. (2004). **Worldwide genetic relationships among Francisella tularensis isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis.** J Bacteriol; 186: 5808-18.

Johansson A, Noppa L, Salomonsson E and Forsberg A. (2015). **Francisella, Molecular Medical Microbiology.** DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00108>; Elsevier; 1199-2006.

- Kantardjiev, T., Ivanov, I., Velinov, T., Padeshki, P., Popov, B., Nenova, R., Mincheff, M. (2006). **Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997–2005**. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 678–680.
- Keim P, Johansson A, Wagner DM. (2007). **Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella**. *Ann N Y Acad Sci*; 1105:30–66.
- Kman N, Nelson R. (2008). **“Infectious agents of bioterrorism: A review for emergency physicians”**. *Emerg Med Clin North Am*; 26: 517-547.
- Larsson P, Oyston, P. Chain, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, Garcia E, Halltorp G, Johansson D, Isherwood DE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Antes R, Malfatti S, Sjostedt A, Svensson K, Thompson N, Vergez L, Wagg JK, Wren BW, Lindler LE, Andersson SG, Forsman M, y Titball RW. (2005). **La secuencia completa del genoma de Francisella tularensis, el agente causante de la tularemia**. *Nat. Gineta.* 37: 153-159.
- Larson MA, Fey PD, Hinrichs SH, Iwen PC. (2014). **Francisella tularensis bacteria associated with feline**. *Tularemia in the United States.* :2068-71
- Larson MA., Nalbantoglu U, Sayood K, Zentz EB, Zing Cer R, Iwen PC, Francesconi SC, Bishop-Lilly KA, Mokashi VP, Sjostedt A. y Hinrichs H. (2016). **Reclassification of Wolbachia persica as Francisella persica comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae**, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1200–1205.
- León Tapia, M.A. (2014). **Los roedores múridos de México: los pequeños mamíferos exitosos**. *CONABIO. Biodiversitas*, 113:8-11
- Lopes de Carvalho I, Nuncio MS, David de Morais J. (2009). **Tularémia**. *Acta Med Port*; 3:281–90
- Luke A, d’Hemecourt P. (2007). **“Prevention of infectious diseases in athletes”**. *Clin Sports Med*; 26: 321-344
- Lupi O, Madkan V, Tying S. (2006). **“Tropical dermatology: Bacterial tropical diseases”**. *J Am Acad Dermatol*; 54: 559-578.
- McCoy GW, Chapin CW. (1912). **Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, Bacterium tularensis**. *J Infect Dis*; 10:61–72.
- Mandell GL, Bennett JE, Mandell DR. (2005). **Bennet’s principles and practice of infectious diseases**, vol. 2. Elsevier, Churchill Livingstone; p. 2674–83.

- Manrique-Saide, Pablo Camilo, Briceño-UC, Ángel Roberto, Ibáñez-Bernal, Sergio, & Sandoval-Ruiz, César Antonio. (2012). **Tábanos (Diptera: Tabanidae) de la selva mediana del sur de Yucatán, México**. *Acta zoológica mexicana*, 28(3), 497-506.
- Marty A. (2006) **“Anatomic laboratory and forensic aspects of biological threat agents”**. *Clin Lab Med* 2006; 26: 515-540.
- Mattix M, Zeman D, Moeller R (2006). **“Clinical aspects of animal and zoonotic diseases of bioterrorism”**. *Clin Lab Med*; 26: 445-489.
- Mejenes-López, Sol de Mayo Araucana, Hernández-Bautista, Maribel, Barragán-Torres, Javier, & Pacheco Rodríguez, Jesús. (2010). **Los mamíferos en el Estado de Hidalgo, México**. *Therya*, 1(3), 161-187.
- Montejo M, Pérez-Irezabal J, González de Zarate P, Aguirrebengoa K, Vicente JM, Martínez E, (1998) **Tularemia: descripción de 16 casos procedentes de la Comunidad de Castilla-León**. *Rev Clin Esp*; 198:794-8.
- Moran G, Talan D, Abrahamian F. (2008). **“Biological terrorism”**. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 145-187.
- Morner T. (1992). **The ecology of tularaemia**. *Rev Sci Tech* 1992;11(4):1123–30.
- Niebylski M. L., Peacock M. G., Fischer E. R., Porcella S. F., Schwan T. G. (1997). **Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus Francisella** *Appl Environ Microbiol* 63 3933–3940
- Nigrovic L, Wingester S. (2008) **“Tularemia”**. *Infect Dis Clin North Am*; 22: 489-504.
- Nicolasora N, Kaul D. (2008). **“Infectious disease emergencies”**. *Med Clin North Am*; 92: 427-441.
- Noda H., Munderloh U. G., Kurtti T. J. (1997). **Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals**. *Appl Environ Microbiol* 63 3926–3932.
- Nowak, R.M. (1991). **Walker's mammals of the world**. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA
- Ohara S. (1954) **Studies on yato-byo (Ohara's disease, tularemia in Japan)**. I. *Jpn J Exp Med*; 24:69–79.
- Ohara H. (1925). **Human inoculation experiment with a disease of wild rabbits, with a bacteriologic study**. *Kinsei Igaku*;401.

- Olsufiev GN, Khatenever LM (1943). **Infeción Tularemia**. Moscú, Rusia: Parasitología de la tularemia; pp. 74-92.
- O'Neill S. L., Giordano R., Colbert A. M., Karr T. L., Robertson H. M. (1992). **16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects** Proc Natl Acad Sci. 89 2699–2702
- Oyston PC. (2008) **Francisella tularensis: unraveling the secrets of an intracellular pathogen**. J Med Microbiol 2008; 57(Pt. 8):921–30.
- Oyston, PC, A. Sjöstedt, y RW Titball. 2004. **La tularemia: defensa contra el bioterrorismo renueva el interés por *Francisella tularensis***. Nat. Rev. Microbiol. 2 : 967-978.
- Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. (2009). **Trabajando hacia el futuro: una visión de *Francisella tularensis* patogénesis y desarrollo de vacunas**. Microbiol Mol Biol Rev ; 73 : 684-711 y. 10.1128 / MMBR.00028-09
- Page RD, Cruickshank RH, Dickens M, Furness RW, Kennedy M, Palma RL y VS Smith (2004). **Phylogeny of "Philoceanus complex" seabird lice (Phthiraptera: Ischnocera) inferred from mitochondrial DNA sequences**. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 633-652.
- Pérez, T., & Guzmán-Cornejo, C., & Montiel-Parra, G., & Paredes-León, R., & Rivas, G. (2014). **Biodiversidad de ácaros en México**. Revista Mexicana de Biodiversidad, 85 , 399-407.
- Perry B. (2006). **“Biological weapons: An introduction for surgeons”**. Surg Clin North Am 2006; 86: 649-663.
- Petersen, JM, y Schriefer (2005). **La tularemia: surgimiento / resurgimiento**. Veterinario. Res. 36 : 455-467.
- Redford, K.H. y Eisenberg, J.F. (1992). **Mammals of the Neotropics** Vol. 2: The Southern Cone. The University of Chicago Press. Chicago, IL., EUA.
- Saliba, G.S., Harmston, F.C., Diamond, B.E., Zymet, C.L., Goldenberg, M.I., Chin, T.D., (1966). **An outbreak of human tularemia associated with the American dog tick, *Dermacentor variabilis***. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15, 531–538.
- Sandström, G., A. Sjöstedt, M. Forsman, (1992). **Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan**. J Clin Microbol 30:172–175.

- Scheel O, Sandvik T, Hoel T, (1992). **Tularemia in Norway. A clinical and epidemiological review.** Tidsskr Nor Laegeforen;112(5):635–7.
- Sjostedt, A., G. Sandstrom y A. Tarnvik. (1992). **Humoral y la inmunidad mediada por células en ratones a una lipoproteína de 17 kilodaltons de *Francisella tularensis* expresados por *Salmonella typhimurium*.** Infectar. Immun. 60 : 2855-2862.
- Sjostedt AB. Francisella. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, (2005). **El proteobacterias, manual de la bacteriología sistemática de la parte B. Bergey.** 2ª ed. Nueva York: Springer-Verlag, pag. 200-10.
- Sjostedt A. (2007). **La tularemia: la historia, la epidemiología, la fisiología de patógenos, y las manifestaciones clínicas.** Ann NY Acad Sci; 1105: 1-29 y. 10.1196 / annals.1409.009
- Senol M, Ozcan A, Karıncaoglu Y, Aydin A, Ozerol IH. (1999). **Tularemia: A case transmitted from a sheep.** Cutis; 63: 49-51.
- Suitor E. C., Weiss E. (1961). **Isolation of a rickettsialike microorganism (*Wolbachia persica*, n. sp.) from *Argas persicus* (Oken)** J Infect Dis. 108 95–106.
- Suitor E. C. Jr. (1964). **The relationship of *Wolbachia persica* Suitor and Weiss to its host.** J Insect Pathol 6 111–124.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiski A., and Kumar S. (2013). **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution30: 2725-2729.
- Taylor, J.P., G.R. Istre, T.C. McChesney, et al. (1991). **Epidemiologic characteristics of human tularemia in the southwest-central states, 1981–1987.** Am J Epidemiol 133:1032–1038.
- Titball, R.W., Sjostedt, A., (2003). ***Francisella tularensis*: an overview.** ASM News 69, 558–563.
- Toledo, A., Olmeda, A.S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M.A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P., (2009). **Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 67–74.
- Tularemia-United States, (2000). **From the Centers for Disease Control and Prevention.** JAMA 2002;287:1519-20
- Tularemia United States, (2000) **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2002;51(9):181–4.

- Varios autores. (2007). **WHO Guidelines on Tularemia**. NLM Classification: WC380, Ginebra, Suiza, 3-125
- Vega J, Miranda A, Cuadrado C, Samaniego E, Bordel MT. (2003) **Actualización de la turalemia en España**. *Actas Dermosifiliogr* 2003;94(4):236-42
- Vincent A et al. "Bacterial diseases". En Bologna J, Jorizzo J, Rapini R. (2003). **Dermatology**. 2a ed. Nueva York, Mosby Elsevier, 1098.
- Weisburg W. G., Dobson M. E., Samuel J. E., Dasch G. A., Mallavia L. P., Baca O., Mandelco L., Sechrest J. E., Weiss E., Woese C. R. (1989). **Phylogenetic diversity of the Rickettsiae**. *J Bacteriol* 171 4202–4206
- Weiss E., Dasch G. A., Chang K.-P. (1984). **Genus VII. Wolbachia** In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 711–713. Edited by Krieg N. R., Holt J. G. Baltimore, MD Williams & Wilkins.
- Wherry WB, Lamb BH. (1914) **Infection of a man with Bacterium tularense**. *J Infect Dis*; 15:331-40.
- World Health Organization working group on Tularaemia. (2007). **WHO Guidelines on Tularaemia**; 115p.

11. Anexos

11.1 Anexo I: Extracción de DNA de tejido.

Procedimiento:

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

1. Cortar un fragmento de 20 mm de hígado y 10 mm de bazo. Cada muestra debe ser correctamente etiquetada y colocada en un tubo Eppendorf , al cual se añadieron 180 μ L del Buffer ATL
2. Se agregaron 20 μ L de Proteinasa K, y se mezcló utilizando el vórtex. Posteriormente la muestra se incubó a 56°C hasta que el tejido estuvo completamente lisado.
3. Una vez disgregado el tejido, el tubo se vortexeó por 15 segundos y se agregaron 200 μ L de Buffer AL . y 200 μ L de etanol (96-100%) a la mezcla, la cual se mezcló nuevamente utilizando el vortex.
4. Se pipeteó la mezcla (incluyendo cualquier precipitado) en la columna y se centrifugó a 8000 revoluciones por minuto (rpm) por un minuto, descartando el sobrenadante y el tubo de colecta.
5. Se ajustó un nuevo tubo de colecta a la columna y se adicionaron 500 μ l del Buffer AW1, centrifugando por un minuto a 8,000 rpm y descartando nuevamente tanto el sobrenadante como el tubo de colecta.

6. Nuevamente, se ajustó un nuevo tubo de colecta y se adicionaron 500 μ l del Buffer AW2, centrifugando por tres minutos a 14,000 rpm para lavar la membrana DNeasy.
7. Finalmente se colocó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 200 μ l de Buffer de elución AE.
8. 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 cual se congeló a una temperatura de -20°C hasta su uso.

11.2 Anexo II: Biología del hospedero

Peromyscus beatae (Thomas, 1903)

Ratón mediano, el largo de su cola es similar al largo de su cuerpo. Su parte dorsal es color café oscuro con una franja de pelo negruzco en la línea media del dorso. Los costados son de una tonalidad café tabaco con una delgada línea amarillo-naranja que va de las mejillas a las extremidades traseras. La región ventral es blanca en la punta, con un mechón negro, la cola es negra en la parte dorsal y blanca en la parte ventral. Las extremidades traseras son blancas, oscureciéndose hacia los tobillos. Las orejas son color café-negruzcas (Ceballos, 2014).





Figura 1-4 *Peromyscus beatae*. 1. Vista dorsal. 2-3. Vista lateral. 4. Vista ventral.

Habita comúnmente en bosques mesofilos en el lado este de la Sierra Madre Oriental. Es común en los bosques húmedos. El suelo rocoso, los derrames volcánicos y los matorrales también son apropiados para esta especie. Es nocturno y puede coexistir con *P. melanotis* y *P. levipes*. Con respecto a su reproducción, la única información conocida es de individuos reproductivamente activos capturados de octubre a noviembre.

***Reithrodontomys sumichrasti* (Saussure, 1861)**

Se caracteriza por el surco en los incisivos, por sus largas orejas, por sus ojos prominentes y, sobre todo, por su cola larga y su tamaño más pequeño en comparación con otros géneros de ratones de campo. La coloración dorsal varía con la subespecie. El color de la espalda varía desde canela oscura a gris y naranja. Las mejillas y los costados son más oscuros. El vientre es generalmente más claro y varía de canela a marrón o rosa leonado a rosa canela. La cola es marrón o marrón oscuro en la parte posterior y más clara en la parte anterior. En las extremidades, el tarso y el carpo son oscuros, pero la parte posterior de las patas traseras varía de blanco, canela y rosa a rosa canela (Ceballos, 2014).





Figura 5-7. *Reithrodontomys sumichrasti*. 5. Vista dorsal 6. Vista lateral y 7. Vista ventral

Esta especie vive en una gran variedad de hábitats; se puede encontrar en bosques de clima subtropical o templado, y en sustrato seco, rocoso, arenoso o muy húmedo. Puede ser simpátrico con *R. chrysopsis*, *R. megalotis*, *R. fulvescens*, *R. mexicanus* y *R. microdon*. Otras especies con las que también se ha capturado son *Oryzomys alfaroi*, *O. couesi*, *Microtus cuasiater*, *Peromyscus difficis*, *P. beatae*, *P. boylii*, *P. melanotis* y *P. zarhynchus*. Su distribución vertical está por encima de *R. megalotis* y por debajo de *R. chrysopsis*. (Ceballos, 2014).

***Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)**

La rata noruega presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. El color, en general, es café o gris oscuro en las partes superiores, con pelos negros alternados y un color más claro grisáceo en el vientre. Las hembras tienen 12 mamas. Al igual que el resto de los roedores, posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores lo que ocasiona que haya un diastema. Sus incisivos crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base.

México Esta especie se encuentra fuertemente asociada a las poblaciones humanas. Por lo anterior, su distribución en el país se puede ver reflejada en la distribución misma de los núcleos poblacionales.

Como especie nativa: Esta especie es muy común en zonas urbanas. De acuerdo con Nowak (1991) no se encuentra en bosques primarios. Originalmente pudo haber vivido a lo largo de bancos a la orilla de los ríos en Asia y se extendió a medida que se creaban los canales y campos de arroz. Actualmente es posible encontrarlas asociadas a asentamientos humanos en donde haya disponibilidad de alimentos. De acuerdo con Redford y Eisenberg (1992), en la Patagonia está fuertemente asociada a centros urbanos grandes y no penetra en hábitats no perturbados.

***Mus musculus* (Linnaeus, 1758)**

El ratón casero es una especie de roedor pequeña, que no rebasa los 21 cm de largo total y se caracteriza por poseer una cola aparentemente desnuda, pero con vellosidades finas. El color puede variar mucho, desde el gris claro hasta el café o negro y combinaciones de los anteriores. Generalmente es café claro o negro en las partes superiores del cuerpo y claro o blanco ventralmente; la cola es más clara por debajo. Las formas comensales tienden a tener cola más larga y pelaje más oscuro que las formas salvajes. Los pies posteriores son en general angostos y los dedos externos tienden a ser más cortos. Las hembras tienen 10 o 12 mamas. Al igual que el resto de los roedores, posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores, lo que ocasiona que haya un espacio vacío. Sus incisivos tienen una muesca y crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base.



Figura 8-10. *Mus musculus*. 8. Vista dorsal. 9. Vista lateral 10. Vista ventral

En México esta especie se encuentra fuertemente asociada a las poblaciones humanas. Por lo anterior, la distribución de la misma en el país se puede ver reflejada en la distribución misma de los núcleos poblacionales con un radio de 2Km.

Como especie nativa: El hábitat natural de esta especie puede ser de tipo boscoso, sabanas y pastizales, incluso en zonas rocosas. Algunas poblaciones pueden ser totalmente dependientes de zonas habitadas por humanos o campos de cultivo. Poblaciones silvestres de esta especie han sido encontradas viviendo en grietas de rocas o paredes o en túneles subterráneos, constituidos generalmente de una red compleja de túneles con varias cámaras para anidamiento y almacén de comida. En lugares habitados por humanos ocupan una gran diversidad de lugares, desde montones de basura y madera, hasta almacenes y otros sitios escondidos cerca de una fuente de alimento (Nowak, 1991). Es una especie fuertemente asociada a los asentamientos humanos como especie comensal y aunque es buena trepadora no anida en árboles (Redford y Eisenberg, 1992).

***Sorex ventralis* (Merriam, 1895)**

Es una pequeña musaraña. La parte posterior es de sepia marrón a oscura, el abdomen es un poco más claro. Las caderas tienen pelos de color marrón oscuro que se extienden 0,75 mm más allá del pelaje dorsal. Su tercer diente unicuspíde superior es más pequeño que el cuarto. Los I1s tienen un diente mediano ubicado dentro del pigmento. Los i1s tienen dos dentículos, espacios interdenticulares poco profundos, pigmento en una sección y una tira larga de pigmento en el borde anteromedial. El tamaño del cráneo tiene una longitud condilobasal de menos de 17,4 mm. (Ceballos, 2014).





Figura 11-13. *Sorex ventralis*. 11. Vista dorsal. 12. Vista lateral. 13. Vista ventral.

No se conocen los detalles de la biología de la musaraña de vientre castaño. Las únicas referencias de tipo de hábitat son aquellas en las que ha sido capturado en un bosque de coníferas. Su dieta probablemente incluya invertebrados, algunos materiales vegetales (semillas, musgos) y, en ocasiones, carroña. Se sabe que se ha capturado con *Habromys lepturus*, *Peromyscus azrecus oaxacensis* y *Peromyscus boylii*. El período de gestación probablemente dura poco menos de un mes y su longevidad es de uno a dos años.

11.3 Anexo III

Dendrograma de las subespecies de *Francisella tularensis* realizado con el método de Neighbor Joining,



0.02

