



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO DE *BARTONELLA SP.* y *YERSINIA PESTIS* EN PULGAS DE
ROEDORES SILVESTRES EN EL NORTE DE CHIHUAHUA, MÉXICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

PRESENTA:

ADRIANA MARLEN FERNÁNDEZ GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. RAFAEL ÁVILA FLORES

Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

COMITÉ TUTOR: GERARDO SUZÁN AZPIRI

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

KENNETH L. GAGE

Centro de Control y Prevención de Enfermedades, Fort Collins, Colorado, EUA.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A mi esposo Sergio que además de ser mí amigo y confidente, ha sido un pilar en mi desarrollo profesional. Sin duda el mejor compañero de vida.

A mi hijo Sergio David que con su llegada motivó la culminación de esta tesis.

A mis padres quién siempre han sido una parte esencial en el desarrollo de mi vida profesional y personal.

A mi hermana por mostrarme con el ejemplo el camino al éxito.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda las personas que me apoyaron en campo e hicieron que mis salidas fueran más divertidas (André V. Rubio, Ana L. Viguera Galván, Shiara K. González Padrón, Paola Martínez Duque, Karen Moreno Ortiz and Andrés M. López Pérez). Gracias por todas esas aventuras que pasamos juntos.

Gracias a todas las personas del grupo de Ecología de Enfermedades de la FMVZ, quienes aportan conocimiento y esparcimiento a mi vida.

Gracias a Gerardo Suzán pues sin duda ha sido un ejemplo a seguir en mi desarrollo profesional. Gracias por animarme a salir de México para mejorar como profesionista.

Gracias a Rafa Ávila quién además de ser mi tutor principal es un excelente amigo.

Agradezco a Roxana Acosta quién me enseñó que el mundo de las pulgas es fantástico.

Agradezco a Kenneth L Gage, que además de ser parte de mi comité tutorial, me abrió las puertas del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Fort Collins, CO., para realizar la identificación de pulgas y los análisis moleculares. Gracias por la paciencia durante mis tutoriales y en el laboratorio.

Agradezco el apoyo de Christine B. Graham por la paciencia y enseñanza de las técnicas de laboratorio.

Agradezco a John A Monteneri quién fue un excelente maestro en el arte de la identificación de las pulgas. Gracias por enseñarme que el tai-chi es divertido en horas de trabajo.

Especial agradecimiento a André Rubio quien fue fundamental para la publicación del artículo “Molecular survey of *Bartonella* species and *Yersinia pestis* in rodent fleas (Siphonaptera) from Chihuahua, Mexico”.

Agradezco a Oscar Rico y Iván Castro, quienes aportaron muchísimo en el análisis de los elementos de la estructura de la metacomunidad de pulgas y *Bartonella* sp, que desafortunadamente no se pudieron colocar en esta tesis.

Agradezco la beca brindada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradezco a la a la estación biológica de Janos IE-UNAM, por el hospedaje brindado durante el trabajo de campo.

Agradezco la beca PAEP otorgada por el Posgrado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal de la UNAM, para asistir a la estancia en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Fort Collins, CO.

Esta tesis fue financiada por el proyecto de CONACYT no.179482 y el fondo Scott Neotropical (Cleveland Metroparks Zoo y Cleveland Zoological Society).

Agradezco a mi hermosa familia (Sergio²) por darme felicidad todos los días, los amo.

ÍNDICE

RESUMEN	VIII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Orden Siphonaptera	4
Biología de las pulgas	4
Morfología	4
Orígenes del orden Siphonaptera	4
Ciclo de vida	5
Distribución en México	6
Las pulgas como vectores	7
<i>Bartonella</i> sp.	8
Descripción e Historia	8
<i>Bartonella</i> y las pulgas	9
<i>Yersinia pestis</i>	12
Descripción e Historia	12
La plaga de Justiniano	12
La peste negra	13
La peste moderna	13
Enfermedades ocasionadas por <i>Yersinia pestis</i>	15
Peste bubónica	15
Peste septicémica	15
Peste neumónica	15
<i>Yersinia pestis</i> y las pulgas	16

ESTUDIO MOLECULAR DE ESPECIES DE <i>BARTONELLA</i> Y <i>YERSINIA PESTIS</i> EN PULGAS DE ROEDORES DE CHIHUAHUA, MEXICO.	19
DISCUSIÓN GENERAL	27
CONCLUSIÓN	29
REFERENCIAS	30

RESUMEN

En los últimos años se ha observado un incremento en el número de enfermedades infecciosas que afectan al hombre, y las bacterias son causantes del más del 50% de estas. *Bartonella* spp. y *Yersinia pestis* son bacterias zoonóticas que son transmitidas al ser humano a través de pulgas (Siphonaptera). En este trabajo usamos técnicas moleculares para detectar ambas bacterias en pulgas de roedores silvestres que habitan en la Reserva de la Biósfera de Janos (RBJ) en Chihuahua, México, e identificamos su nivel de asociación con las distintas especies de pulgas y roedores de la comunidad. Seleccionamos dos sitios conformados por un mosaico de mezquite y pastizal natural. La captura de roedores se realizó en marzo 2013 utilizando seis cuadrantes de 7 x 7 trampas Sherman por sitio. Cada roedor fue revisado para colectar las pulgas que posteriormente fueron analizadas mediante una PCR usando los genes *gltA* (338-bp) y *pla* (478-bp) de *Bartonella* y *Y. pestis* respectivamente. De las 760 pulgas colectadas 307 fueron positivas a *Bartonella* sp. (40.4%), y ninguna a *Y. pestis*. El análisis de regresión lineal reveló que la variable *especie de pulga* fue la más asociada a la presencia *Bartonella* sp. El análisis de diversidad genética de *Bartonella* sp. mostró 13 genotipos agrupados en cinco filogrupos, dos de los cuales se asociaron a especies de *Bartonella* que se reconocen como patogénicas para el hombre, y la existencia de un nuevo filogrupo asociado a pulgas específicas de ratas canguro (*Dipodomys* spp.). Este estudio aporta información nueva acerca de la diversidad genética de *Bartonella* sp., en pulgas de roedores silvestres, y aunque no se detectó la bacteria *Y. pestis* en las pulgas, si se documentó la presencia de la pulga *Oropsylla hirsuta*, que es considerada como vector competente de dicha bacteria.

Palabras clave: *Bartonella*, *Yersinia pestis*, pulgas, México.

ABSTRACT

In recent years, the number of infectious diseases affecting humans has greatly increased with more than 50% of them having a bacterial origin. *Bartonella* spp. and *Yersinia pestis* are zoonotic bacteria that are transmitted to humans by fleas (Siphonaptera). In this study, we used molecular techniques to detect both bacteria in fleas of rodents that live in the Biosphere Reserve of Janos (RBJ) in Chihuahua, Mexico, and we identified their level of association with the species of fleas and rodents we find in the community. We selected two sites characterized by a mixture of shrubland and grassland. In March 2013, we captured rodents in six quadrants of 7 x 7 Sherman traps per site. Each rodent was deloused and the collected fleas were subsequently analyzed by PCR using the *gltA* (338-bp) and *pla* (478-bp) genes of *Bartonella* and *Y. pestis* respectively. Of the 760 fleas collected 307 were positive to *Bartonella* sp. (40.4%), and none one to *Y. pestis*. The linear regression analysis showed that the variable *flea specie* exhibited the highest association with the presence of *Bartonella* sp. The analysis of genetic diversity of *Bartonella* sp. showed 13 genotypes grouped into five phylogroups, two of which were associated with *Bartonella* species that are recognized as pathogenic for human, and the existence of a new phylogroup associated with specific flea kangaroo rats (*Dipodomys* spp.). This study provides new information about the genetic diversity of *Bartonella* sp. in rodent fleas. Although *Y. pestis* was not detected in rodent fleas, we documented the presence of the flea *Oropsylla hirsuta*, which is considered as competent vector of this bacterium.

Key words: *Bartonella*, *Yersinia pestis*, fleas, México

INTRODUCCIÓN

A través del tiempo la presencia de enfermedades infecciosas emergentes (EI) se ha ido incrementando, de acuerdo con Jones y *col.* (2008) el 72% de las EI, que son capaces de afectar al hombre, tienen sus orígenes en la fauna silvestre. Su propagación puede ser a través de distintas vías, dependiendo del microorganismo del cual se trate. En el caso de los virus y las bacterias, la vía de transmisión más común es mediante vectores (organismos que son eficientes en la transmisión de microorganismos a sus huéspedes), entre los cuales destaca la presencia de los artrópodos (Taylor et al. 2001).

Uno de los artrópodos que se considera como vector eficiente en la transmisión de algunas enfermedades infecciosas, es la pulga (Siphonaptera). Esto se debe en gran parte a su capacidad para moverse entre distintos hospederos y alimentarse de ellos. La mayoría de las especies de pulgas pueden alimentarse de varios hospederos que pertenezcan a distintas especies (oligoxeno), géneros (pleioxeno), e inclusive familias y órdenes (polixeno) (Medvedev y Kotti 2013). Esto permite que las pulgas dispersen los microorganismos entre las distintas poblaciones y comunidades de hospederos, favoreciendo la emergencia y reemergencia de las EI (Stevenson et al. 2013).

Bartonella spp. y *Yersinia pestis* son bacterias con una amplia distribución, ambas son patógenos zoonóticos y son transmitidas por pulgas. El género *Bartonella* tiene alrededor de 30-40 especies y subespecies, de las cuales tres causan enfermedades que se reconocen por la sintomatología que provocan (carrión o verruga peruana es causada por *B. bacilliformis*, la fiebre de las trincheras por *B. grahamii* y la enfermedad del arañazo de gato causada por *B. henselae*), y otras pueden ocasionar problemas en algunos órganos como el corazón, el sistema nervioso, el hígado y el páncreas, entre otros (Jacomo et al. 2002; Kosoy et al. 2012; Buffet et al. 2013). Por otro lado, *Y. pestis* fue la bacteria responsable de la muerte de millones de europeos en el siglo XIV, y a pesar de que es considerada una enfermedad antigua, actualmente se presenta en una amplia gama de hospederos y pulgas. Esta bacteria puede provocar tres formas distintas de enfermedad en el hombre, la bubónica que se caracteriza por la inflamación de ganglios linfáticos a los que

llaman bubones, la forma septicémica que provoca necrosis en los tejidos, y la neumónica, que es la menos común pero tiene un alto índice de mortalidad (Gage y Kosoy 2005; USGS 2012).

Estudios desarrollados en Norteamérica han contribuido a conocer más cercanamente la dinámica de estas bacterias, y revelan que su presencia se ve favorecida por las interacciones que hay entre roedores y pulgas (Stevenson et al. 2003; Morway et al. 2008; Stapp et al. 2009; Tripp et al. 2009; Brinkerhoff et al. 2010a; Billeter et al. 2011). Por ejemplo, las pulgas contribuyen a dispersar y a promover la diversidad de *Bartonella* spp. debido a la relativa especificidad que tienen hacia sus hospederos (Tsai et al. 2011), mientras la intensidad y abundancia de pulgas puede influir en la tasa de transmisión de *Y. pestis* en perros de las praderas (*Cynomys ludovicianus*), provocando una alta mortalidad de individuos dentro de la colonia (Gage and Kosoy 2005; Stenseth et al. 2008; Tripp et al. 2009).

Debido a que en México se han desarrollado pocas investigaciones enfocadas al estudio de estas bacterias (Bai et al. 2009; Zapata et al. 2012; Rubio et al. 2014), este trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis molecular para detectar la presencia de *Bartonella* spp. y *Y. pestis* en pulgas de roedores silvestres, con la finalidad de conocer su contribución en el mantenimiento de estas bacterias. Para ello seleccionamos dos localidades en la Reserva de la Biósfera de Janos (RBJ) en Chihuahua, México. Esta reserva se localiza al noroeste de Chihuahua, y se caracteriza por tener un clima árido con veranos calientes y lluvias invernales. La vegetación conformada en gran parte por pastizales y en menor grado por áreas de matorral y bosque, permite que la reserva conserve una de las poblaciones más grandes de perros de las praderas (*C. ludovicianus*) (CONANP 2006). La RBJ colinda con el sur de Nuevo México, estado en el que se han reportado casos de *Bartonella* spp. y *Y. pestis* en animales silvestres y en humanos (Craven et al. 1993; Bai et al. 2009; Friggens et al. 2010; Kiersten et al. 2015), por lo que resulta un área importante para el estudio de ambas bacterias.

Además, la región de la RBJ posee algunas de las características bióticas y abióticas necesarias para que *Bartonella* sp. y *Y. pestis* estén presentes, es por ello que la información generada a partir de esta investigación y el estudio simultaneo en tiempo y espacio de pulgas, roedores y bacterias, podría servir de base para la toma de decisiones preventivas.

ANTECEDENTES

Orden Siphonaptera

Biología de las pulgas

Morfología

El orden Siphonaptera está conformado por pequeños invertebrados conocidos comúnmente como pulgas. Estos organismos poseen características morfológicas que permiten su adaptación a una amplia gama de hospederos como mamíferos y aves. Este orden se destaca por poseer un cuerpo esclerotizado y aplanado lateralmente, con cerdas y espinas que les permiten adherirse al pelo, plumas o piel de sus hospederos (Kim 1985).

El cuerpo de las pulgas está dividido en tres estructuras principales: la cabeza, el tórax y el abdomen. La cabeza tiene un par de ojos localizados lateralmente sobre la cabeza, estos suelen ser bien desarrollados en especies que infestan hospederos con hábitos diurnos, mientras que las especies que prefieren hospederos con hábitos nocturnos o que pasan gran parte de su vida en madrigueras, poseen ojos poco desarrollados o carecen de ellos (Kim 1985; Acosta y Morrone 2003). Para alimentarse, las pulgas usan tres piezas bucales (palpos labiales sensoriales, lacinias y epifaringe) diseñadas para localizar fácilmente la sangre y succionarla (Morand et al. 2006).

El tórax está compuesto por tres segmentos torácicos (protórax, mesotórax y metatórax), y en cada uno de ellos se encuentra un par de extremidades conformadas por cinco estructuras principales: coxa, trocánter, fémur, tibia y cinco tarsos. Mientras que los segmentos torácicos son la base para la locomoción, los segmentos abdominales conformadas por bandas esclerotizadas llamadas terguitos, constituyen la estructura que protege los órganos vitales para la digestión, excreción y reproducción de las pulgas (Acosta y Morrone 2003).

Orígenes del orden Siphonaptera

El origen de este orden aún no se ha descifrado completamente, sin embargo, los hallazgos de fósiles de ámbar báltico que corresponden al Eoceno/Oligoceno, y del fósil

(*Pulex larimerius*) encontrado en la República Dominicana (Mioceno), sugieren que el antecesor de este orden surgió a inicios de la era Cenozoica (Dampf 1910; Peus 1968; Lewis y Grimaldi 1997). Por otro lado, un estudio reciente en el que analizan el ADN de varias especies de pulgas, sugiere que la aparición de este orden ocurrió a finales de la era Mesozoica, y que los nuevos linajes corresponden al límite KT (Cretácico-Terciario) (Zhu et al. 2015).

En sus inicios la clasificación de este orden se realizó tomando en cuenta las características más sobresalientes y fáciles de distinguir, como la distribución y número de las espinas, cerdas y ctenidios, en la cabeza, tórax y abdomen (Fox 1940; Traub 1972; Furman y Catts 1928). Esta forma de identificación descriptiva permitió generar claves taxonómicas para poder identificar las especies de pulgas, sin embargo, con el avance de la ciencia se han comenzado a realizar estudios moleculares que buscan respaldar esta clasificación (Whiting 2000 ab; Whiting et al. 2008; Zhu et al. 2015).

Las técnicas moleculares y los distintos análisis filogenéticos que se pueden realizar actualmente, han comenzado a generar discrepancia en el agrupamiento de las familias. Por ejemplo: algunos estudios que se basan en el análisis de las características morfológicas y la relación pulga-hospedero, muestran que las familias Pulicidae y Tungidae son hermanas, sin embargo, a nivel molecular estas familias se muestran separadas (Lewis 1998; Medvedev 1998; Whiting et al. 2008; Zhu et al. 2015). Por otro lado, el número de especies de pulgas y el número de genes involucrados en los análisis moleculares, han originado distintos resultados. El estudio realizado por Whiting y *col.* (2008) muestra que la familia Tungidae es la más ancestral, pero el estudio de Zhu y *col.* (2015), en el que analizan un mayor número de genes y especies de pulgas, muestra que la familia más vieja es la Macropsyllidae.

Ciclo de vida

Las pulgas son ectoparásitos holometábolos, es decir, que su ciclo de vida inicia como embriones (huevo), pasan por los estados de larva y pupa, y finalmente llegan a adultos. El ciclo de vida inicia con el apareamiento que puede llevarse a cabo sobre el huésped o en los sitios de descanso de este, posteriormente la hembra coloca los huevos

entre el pelaje o plumas del huésped, o en sus refugios (Morand et al. 2006). El número de huevos y la eclosión de los mismos, dependen de la biología de la especie de pulga, o de factores extrínsecos como la calidad de la sangre con la que se alimenta, la densidad de pulgas por hospedero y del ambiente que los rodea (temperatura y humedad), sin embargo, se calcula que la eclosión puede presentarse entre 1 a 10 días (Rothschild 1975; Hsu y Wu 2000; Khokhlova et al. 2007).

Al igual que los huevos, las larvas dependen de factores externos para su sobrevivencia como temperatura, humedad y disponibilidad de alimento. A diferencia de las pulgas adultas (imago), las larvas se alimentan de materia orgánica y de heces de pulgas adultas para sobrevivir. Las larvas pasan por tres fases que duran entre 2 y 21 días dependiendo de la especie. En la última fase, la larva expulsa su contenido digestivo, construye un capullo de seda, y busca el camuflaje con partículas que se adhieren del substrato del nido o madriguera para llegar al estado de pupa (Morand et al. 2006).

Las pupas pueden detener su desarrollo por semanas si no tienen el estímulo adecuado para emerger, y la clave parece estar en la temperatura a la se encuentran expuestas. Sin embargo, otros factores como la humedad, movimiento del huésped, y el CO₂, pueden favorecer su eclosión (Silverman y Rust 1985). Una vez que emergen del capullo, los imagos buscan alimentarse del hospedero.

Distribución en México

Actualmente se han descrito alrededor de 2,575 especies y subespecies de pulgas en el mundo (Lewis 1998; Whiting et al. 2008). Su distribución es cosmopolita incluyendo la Antártida, sin embargo, en las regiones Paleártica, Neotropical, Afrotropical y Neártica, se concentra la mayor riqueza de especies (Medvedev 2000ab; Whiting et al. 2008). México tiene dos de las regiones más ricas (Neotropical y Neártica), sin embargo, solo se han registrado 172 especies de pulgas distribuidas en 52 géneros, 8 familias y 4 superfamilias (Acosta-Gutiérrez 2014).

La escasa información de la riqueza de pulgas en el territorio mexicano, se debe a que los estudios de campo de mamíferos y aves, rara vez consideran la colecta de pulgas. A pesar de esto, autores como Traub (1950), Morales-Muciño y Llorente-Bousquets (1968),

Ponce y Llorente (1996), y Acosta (2005), han contribuido a generar información acerca de la distribución, taxonomía y asociación con sus hospederos.

De acuerdo con Acosta-Gutiérrez (2014), las familias mejor representadas en México son la Ceratophyllidae, Ctenophthalmidae y Pulicidae, que tienen una riqueza de 74, 45 y 24 respectivamente, y las familias con menor riqueza (menos de 10 especies registradas) son la Ischnopsyllidae (10), Hystrichopsyllidae (8), Rhopalopsyllidae (8) y Leptopsyllidae (3). Esta información debe de tomarse con cautela, ya que el número de especies que integran estas familias proviene de colectas que se realizaron principalmente en estados del centro y sur de México.

Las pulgas como vectores

Las pulgas (Siphonaptera) son artrópodos hematófagos con una amplia distribución, y son capaces albergar y transmitir microorganismos que afectan a mamíferos incluyendo al hombre. La transmisión de estos microorganismos se puede presentar mediante dos vías, la oral, a través de la regurgitación de sangre de la cual se alimentan, y la vía fecal, con heces infectadas (Whiting et al. 2008; Bitam et al. 2010). La gran riqueza de especies y la habilidad que poseen para alimentarse de distintos hospederos hacen que las pulgas sean vectores potenciales para la dispersión de EI (Lewis 1998; Whiting et al. 2008; Medvedev y Kotti 2013).

Las pulgas son vectores importantes de algunas EI de carácter zoonótico. Por ejemplo, La tularemia es una enfermedad transmitida por la bacteria *Francisella tularensis*, esta se transmite por distintos artrópodos, dentro de los cuales las pulgas son importantes vectores, esta enfermedad tiene una amplia distribución y está presente principalmente en países que se encuentran al norte del ecuador (WHO 2007). Otra enfermedad con amplia distribución es el tifus, esta es causada por distintas bacterias del género *Rickettsia*, como *R. typhi*, que es transmitida por la pulga *Xenopsylla cheopis* la cual es capaz de transmitir otras enfermedades zoonóticas como Bartonelosis y Peste bubónica (Brouqui y Raoult 2006; Esisen et al. 2007a; Reeves et al. 2007).

En la actualidad no se reconoce a ninguna especie de pulga como específica del hombre, sin embargo, la domesticación de animales y el crecimiento de asentamientos

humanos provocan que las pulgas se alimenten de huéspedes incidentales como el hombre. Por ejemplo: la pulga *Pulex irritans* que es llamada erróneamente “la pulga del hombre”, suele parasitar animales domésticos como cerdos, perros, gatos y cabras. Otras pulgas sinantrópicas de importancia para la transmisión de EI son: *Ctenocephalides felis felis* (la pulga del gato), *Ctenocephalides canis* (la pulga de perro), *Echidnophaga gallinacea*, *Tunga penetrans* y *Xenopsylla cheopis* (Bitam et al. 2010).

***Bartonella* sp.**

Descripción e Historia

Bartonella sp. es una bacteria Gram negativa, facultativa intracelular y aeróbica que es capaz de infectar los glóbulos rojos y el endotelio vascular de una gran variedad de vertebrados incluyendo a el hombre. Esta bacteria fue aislada y descrita por primera vez en 1905 por Alberto Barton Thompson, sin embargo existen monolitos que indican que la especie *B. bacilliformis* estuvo presente en la época precolombina (Maguiña 2010).

La primera especie descrita fue *B. bacilliformis*, esta es transmitida al hombre por mosquitos del género *Lutzomyia*, aunque se reconoce que la especie *L. verrucarum*, es el principal vector (Townsend 1913). Esta bacteria provoca la enfermedad conocida como enfermedad de carrión, fiebre de oroya o verruga peruana (dependiendo de sus síntomas es como se le reconoce). La enfermedad presenta dos fases: la fase aguda (enfermedad de carrión o fiebre de oroya) se caracteriza principalmente por una anemia severa, fiebre, ictericia, linfadenomegalia, y ocasionalmente provoca derrame pericárdico, anasarca y convulsiones, y la fase crónica, se caracteriza por la presencia de verrugas en cara, miembros superiores y miembros inferiores, aunque también se puede acompañar de palidez, fiebre, dolor articular y linfadenomegalia (Maguiña et al. 2008).

La especie *B. quintana* fue la segunda especie del género *Bartonella* que se descubrió, esto tuvo lugar durante la primera guerra mundial. Esta bacteria causa la enfermedad conocida como fiebre de las trincheras o fiebre quintana, y el piojo humano *Pediculus humanus* es el vector encargado de dispersar esta bacteria (Byam y Lloyd 1920).

Actualmente *B. quintana* se encuentra principalmente en personas con poca higiene, como las personas sin hogar, drogadictos y personas alcohólicas, y causa algunas complicaciones como, endocarditis, angiomas, e infecciones en hígado, bazo y linfonodos (Drancourt et al. 1996; Koehler et al. 1997; Brouqui et al. 1999).

La tercera especie que se caracterizó fue *B. henselae*, esta fue aislada por primera vez de pulgas de gatos (*Ctenocephalides felis*) que presentaban bacteremia a inicios de 1990 (Koehler et al. 1994). Dentro del género de *Bartonella*, esta especie es la más estudiada debido a que afecta a una buena parte de la población de Estados Unidos (Jackson et al. 1993). Se ha sugerido que las heces de las pulgas *C. felis* pueden ser la principal causa de infección en gatos y humanos. En un experimento realizado por Foil y col. (1998), se encontró que solo los gatos que habían sido inoculados por vía intradérmica con heces infectadas de *C. felis* presentaron bacteremia, mientras que los gatos que se sirvieron de alimento de pulgas infectadas no se vieron afectados. Por lo tanto se reconoce que la vía de transmisión de *B. henselae* en gatos y humanos, son las heces contaminadas de pulgas que son inoculadas por las garras contaminadas de estos felinos; de aquí que la enfermedad que causa esta especie de *Bartonella* sea llame “la enfermedad del arañazo de gato”.

El interés cada vez mayor por parte de los investigadores y el desarrollo de nuevas herramientas en biología molecular, han aportado grandes avances en el conocimiento de esta bacteria. En las últimas décadas se han logrado identificar de 30 a 40 especies y subespecies de *Bartonella* asociadas a distintas especies de mamíferos (Kosoy et al. 2012). A pesar de los grandes avances, aún falta mucho para establecer los factores que determinan la transmisión y la sobrevivencia de cada una de estas especies de *Bartonella*.

***Bartonella* y las pulgas**

Bartonella es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida, y esto se debe a su capacidad para sobrevivir en distintos huéspedes y vectores. Esta bacteria se ha logrado identificar en mamíferos domésticos (Por ejemplo: gatos, perros y vacas) y silvestres (Por ejemplo: roedores, murciélagos, delfines, marsopas, belugas, pumas, lince,

guepardos, leones y tigres), y en vectores como mosquitos, piojos, garrapatas y pulgas (Chomel et al. 2009; Kosoy et al. 2010).

Actualmente *Bartonella* es una bacteria muy estudiada dada su importancia zoonótica, sin embargo, la mayoría de las investigaciones se centran en el orden rodentia. Esto puede deberse a que este grupo de mamíferos es el más numeroso (Carleton y Musser, 2005) o a la facilidad con la que este orden se maneja en el campo y en el laboratorio. Las pulgas son los principales ectoparásitos que se encargan de la dispersión de *Bartonella* entre estos pequeños mamíferos; cabe mencionar que el orden rodentia es el que tiene mayor riqueza de especies de pulgas (Marshall 1981).

La complejidad del estudio de esta bacteria en pulgas se debe en gran parte a la eficiencia de transmisión; y es que a pesar de que se detecte cierta especie o subespecie de *Bartonella* en una pulga, no asegura necesariamente su transmisión al huésped. Por ejemplo, el estudio realizado por Abbot y col. (2007) con pulgas de roedores *Sigmodon hispidus*, mostró que algunas cepas de *Bartonella* tienen afinidad tanto por el huésped como por la pulga, y otras solo son detectadas en los roedores o en sus pulgas, lo que sugiere que las pulgas son vectores competentes solo de algunas cepas de *Bartonella*.

Las pulgas son vectores de numerosas especies y sub especies de *Bartonella*. De acuerdo con Bitam y col. (2012) al menos 12 de estas especies y subespecies se han detectado en pulgas, sin embargo, las pulgas son consideradas como vectores competentes de solo 7 de estas especies de *Bartonella*, y en 5 de ellas, las pulgas son consideradas como vectores potenciales. Por otro lado, la información recopilada por Maggi y col. (2012) muestra que las pulgas son vectores competentes de 9 especies y subespecies de *Bartonella* y en el resto (11) son consideradas como vectores potenciales (Cuadro 1).

Las pulgas han ayudado a promover la diversidad de cepas de *Bartonella* en sus huéspedes. Aunque algunas pulgas son específicas de una especie de hospedero, algunas son capaces de alimentarse de huéspedes que pertenecen a distintos géneros, familias u órdenes, lo que origina la dispersión y diversificación de esta bacteria (Medvedev y Kotti 2013). Por ejemplo, los estudios de Bai y col. (2007) realizados en Estados Unidos, y de

Rubio y col. (2014) en México, muestran que hay un alto grado de especificidad entre los genotipos de *Bartonella* y los roedores a nivel de género, sin embargo, hay algunas excepciones. Ambos estudios mostraron que roedores del género *Onychomys* son capaces de albergar genotipos de *Bartonella* que se asocian a roedores *Peromyscus* spp. y *Dipodomys* spp., respectivamente. Esto sugiere que las pulgas de roedores *Onychomys* son capaces de alimentarse de otro roedor, adquirir un genotipo de *Bartonella* no específico de su huésped principal y transmitirlo a este, favoreciendo la dispersión de esta bacteria entre distintos géneros de roedores.

Cuadro 1. Especies y subespecies de *Bartonella*, reservorio principal y pulgas confirmadas como vectores (✓) y vectores potenciales (*). Modificado de Maggi y col. 2012.

Especies y subespecies de <i>Bartonella</i>	Reservorio principal	Pulgas (vector confirmado y potencial)
<i>B. alsatica</i>	Conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	*
<i>B. bacilliformis</i>	Humanos, gatos (<i>Felis catus</i>) y perros (<i>Canis familiaris</i>)	✓
<i>B. birtlesii</i>	Roedor (<i>Apodemus</i> spp.)	*
<i>B. clarridgeiae</i>	Gatos (<i>Felis catus</i>)	✓
<i>B. doshiae</i>	Roedores (<i>Microtus agrestis</i> y <i>Rattus</i> spp.)	✓
<i>B. elizabethae</i>	Roedores (<i>Rattus norvegicus</i>)	✓
<i>B. grahamii</i>	Roedores (<i>Clethrionomys</i> spp. y <i>Apodemus</i> spp.)	✓
<i>B. henselae</i>	Gatos (<i>Felis catus</i>) y perros (<i>Canis familiaris</i>)	✓
<i>B. koehlerae</i>	Gatos (<i>Felis catus</i>) y roedor (<i>Meriones libicus</i>)	✓
<i>B. peromysci</i>	Roedor (<i>Peromyscus</i> spp.)	*
<i>B. quintana</i>	Humanos, roedores (<i>Meriones libicus</i>)	✓
<i>B. rattimassiliensis</i>	Roedores (<i>Rattus</i> spp.)	*

<i>B. rochlimaea</i>	Perros (<i>Canis familiaris</i>)	*
<i>B. talpae</i>	Topo (<i>Talpa europaea</i>)	*
<i>B. taylorii</i>	Roedores (<i>Apodemus</i> spp., <i>Meriones lybicus</i> y <i>Clethrionomys</i> spp.)	✓
<i>B. tribocorum</i>	Roedores (<i>Rattus</i> spp. y <i>Apodemus</i> spp.)	*
<i>B. vinsonii subsp. arupensis</i>	Roedor (<i>Peromyscus leucopus</i>)	*
<i>B. vinsonii subsp. berkhoffii</i>	Coyotes (<i>C. latrans</i>), perros (<i>Canis familiaris</i>) y zorros (<i>Urocyon</i> spp.)	*
<i>B. volans</i>	Ardillas voladoras (<i>Glaucomys volans</i>)	*
<i>B. washoensis</i>	Ardillas de tierra (<i>Spermophilus beecheyi</i>) y conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	*

Yersinia pestis

Descripción e Historia

La peste es una enfermedad aguda zoonótica, que puede ser fatal y es causada por una bacteria altamente virulenta llamada *Yersinia pestis*. Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae, y es considerada una bacteria anaeróbica, Gram negativa, no móvil (Perry y Fetherston 1997).

En 1894 Alexandre Yersin y Shibasaburo Kitasato encontraron de manera independiente esta bacteria en muestras de humanos y roedores durante la epidemia de Hong Kong, sin embargo, al primero es a quién se le atribuye el descubrimiento, pues fue quién acertó describiéndola como una bacteria Gram negativa (USGS 2012). A pesar de que esta bacteria fue descrita en ese año, las primeras descripciones se pueden encontrar en la biblia (Zietz y Dunkerlberg 2004). Actualmente se reconocen tres pandemias causadas por *Y. pestis*: la plaga de Justiniano, la peste negra y la peste moderna.

La plaga de Justiniano

Data de los años 541-544 d.C., y afectó el norte de África, Europa, Asia del sur y Asia central, y Arabia. Esta pandemia adquirió este nombre pues se presentó durante el

imperio Bizantino (también llamado Imperio Romano de Oriente o Bizancio) cuando gobernaba Justiniano I el Grande, las personas afectadas por *Y. pestis* en este imperio presentaron la forma bubónica. Se cree que esta pandemia se originó en Etiopia o en Egipto y posteriormente se esparció a Constantinopla cuando los barcos con granos que también cargaban ratas y pulgas desembarcaron (Perry y Fetherston 1997). Se estima que alrededor del 50-60% de la población murió en la región entre los años 541-700 d.C.

La peste negra

Esta pandemia se presentó en el siglo XIV y se estima que fue responsable de la muerte de 17-28 millones de europeos lo que representó de un cuarto a un tercio de la población (Perry y Fetherston 1997). De acuerdo con una investigación publicada por Wheelis (2002), esta pandemia inició en la ciudad de Caffa (ahora Ucrania), que tenía el principal puerto visitado por grandes buques Genoveses. En 1345 tropas mongoles rodearon esta ciudad pero los militares comenzaron a morir ya que se vieron afectadas por la peste. En un último esfuerzo por invadir la ciudad, los sobrevivientes lanzaron los cuerpos de los hombres infectados con *Y. pestis*. Después de lo ocurrido en Caffa se presentaron brotes de peste bubónica y neumónica en Europa por los siguientes 300 años.

La peste moderna

La tercera pandemia comenzó en la provincia de Yunnan en China en 1855, con el movimiento de tropas y refugiados en la región. La diseminación alrededor del mundo se vio favorecida por el uso de trenes y barcos de vapor. Muchas ciudades en África, Europa, Asia e India, se vieron invadidas por esta bacteria. A diferencia de las pandemias anteriores, esta invadió el continente Americano (Perry y Fetherston 1997).

La epidemia de América del norte comenzó en el año de 1900, cuando un barco con ratas y pulgas infectadas con *Y. pestis*, procedente Hong Kong arribó a la ciudad de San Francisco, California. La peste pronto se esparció por toda la Costa del Pacífico invadiendo ciudades como Seattle, Oakland y los Ángeles lo que resultó en al menos 494 casos humanos con una tasa de fatalidad mayor al 50% (Adjemian et al. 2007). Dos años después

aparecieron brotes de peste en el puerto de Mazatlán en Sinaloa, México (Candil et al. 2009).

América del sur también fue víctima de esta bacteria. A partir de 1899 con la llegada de un barco a Uruguay procedente de Holanda la peste se diseminó, invadiendo gran parte de América del sur. De acuerdo con Faccini-Martínez y Sotomayor (2013), del año 1899 al año 1908, algunos países como Paraguay, Argentina, Brasil, Perú, Chile, Ecuador, Venezuela, Bolivia y Colombia, se vieron afectados debido a la llegada de barcos con roedores y pulgas infectadas, que procedían de países como Holanda, Bélgica, Inglaterra, Birmania y Tailandia.

La amplia distribución de reservorios (roedores) y vectores (pulgas) de *Y. pestis* permitió que la bacteria se presentará en todos los continentes habitados (con excepción de Australia) provocando una pandemia global (Fig. 1).

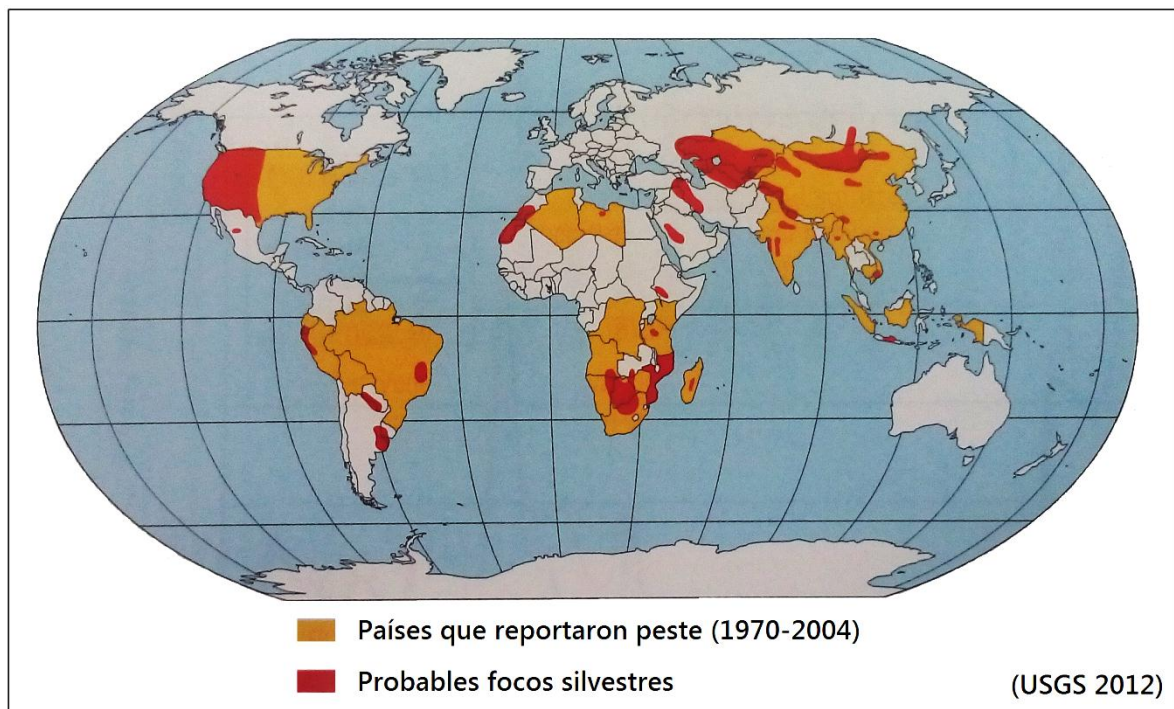


Figura 1. Mapa con países que presentaron peste en los años 1970 a 2004, y probables focos en animales silvestres. Modificado de (USGS) U.S. Department of the interior 2012.

Enfermedades ocasionadas por *Yersinia pestis*

La peste es transmitida por pulgas, sin embargo, la transmisión entre personas puede ocurrir si esta bacteria es inhalada, o bien se puede adquirir por la exposición de heridas a materiales contaminados. Cuando las personas están infectadas la enfermedad puede adquirir tres formas: la bubónica, la septicémica y la neumónica

Peste bubónica

Esta es la más común y por lo regular resulta por la picadura de una pulga infectada, pero también se puede adquirir por heridas expuestas a materiales contaminados. De 2 a 6 días post exposición, los pacientes pueden presentar fiebre, dolor de cabeza, escalofrío, dolor muscular, fatiga, náuseas, vómito y diarrea, sin embargo, la inflamación de los ganglios linfáticos (bubones) es la característica más relevante. Si no se da tratamiento a tiempo, la enfermedad progresa rápidamente, y la bacteria entra al torrente sanguíneo causando una peste secundaria septicémica (Gratz 1999).

Peste septicémica

Esta puede ser primaria o secundaria a la peste bubónica. La peste septicémica primaria se adquiere cuando *Y. pestis* se transmite de forma directa al torrente sanguíneo. Los pacientes presentan síntomas similares a los que causan otras bacterias (fiebre, escalofrío, dolor de cabeza, malestar general y síntomas gastrointestinales), pero también se presenta necrosis y gangrena de extremidades que se desarrolla por la presencia de coágulos de sangre. Sin tratamiento la tasa de mortalidad se encuentra entre un 30% a 50% (Gratz 1999; USGS 2012).

Peste neumónica

Esa forma de enfermedad se presenta cuando las personas entran en contacto directo con aerosoles exhalados por pacientes o animales infectados con esta bacteria. Después de 1 a 3 días post exposición se pueden desarrollar síntomas similares a la gripe común que progresa rápidamente a neumonía con tos, dolor de pecho y esputo con sangre. Esta es la forma de enfermedad menos común en humanos pero tiene una alta mortalidad incluso

cuando hay tratamiento, debido al fallo respiratorio que provoca (Gage 1998; Gratz 1999; USGS 2012).

***Yersinia pestis* y las pulgas**

Los hábitos alimenticios de las pulgas hacen que estos artrópodos sean eficientes en la transmisión de *Y. pestis*, sin embargo cuando una pulga se alimenta de un mamífero infectado la transmisión puede darse de manera inmediata o puede tardar algunos días. Dentro de los primeros cuatro días (fase temprana de transmisión) dependiendo de la especie de pulga de la cual se trate *Y. pestis* puede transmitirse rápidamente a otro hospedero, puede localizarse en el tracto digestivo de la pulga TD (la eficiencia de transmisión depende de su localización en el TD) o puede ser eliminada rápidamente del TD por heces como en el caso de la pulga *Ctenocephalides felis* (Eisen et al. 2006, 2008, 2009).

En algunas ocasiones *Y. pestis* puede acumularse en el proventrículo de la pulga provocando un bloqueo que impide el paso de sangre al estómago. De esta manera cuando la pulga trata de alimentarse, la sangre llega al proventrículo, se mezcla con la bacteria y la sangre infectada es regurgitada nuevamente al hospedero. Al presentar este bloqueo, la necesidad de las pulgas aumenta debido a la inanición provocada por la falta de sangre en el estómago, lo que favorece la probabilidad de transmisión de la bacteria a hospederos no infectados (Burroughs 1947) (Figura 2).

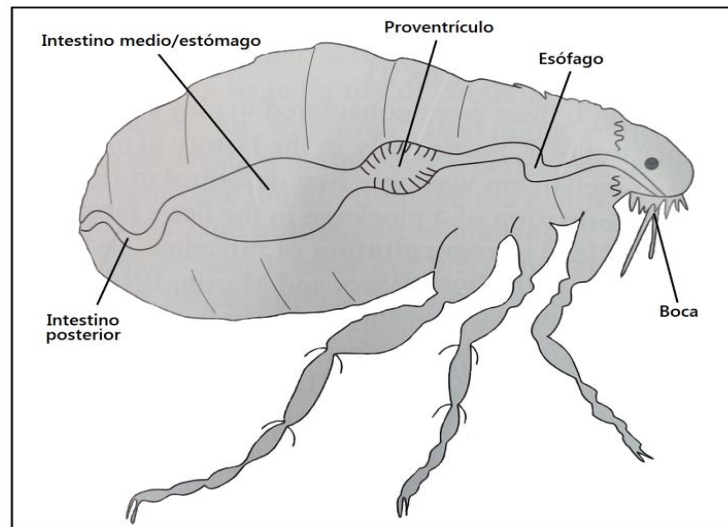


Figura 2. Aparato digestivo de las pulgas

Algunas pulgas son más eficientes en la transmisión de peste, ya sea por que rara vez presentan bloqueo permitiendo que *Y. pestis* se siga transmitiendo (*Oropsylla montana*), o porque son efectivas tanto en la fase temprana de transmisión como en la fase de bloqueo (*Xenopsylla cheopis*) (Engelthaler et al. 2000; Eisen et al. 2007b). De acuerdo con Gage (1998) y Gratz (1999) alrededor de 20 géneros de pulgas son huéspedes naturales de *Y. pestis* (Cuadro 2), sin embargo, solo algunas son muy eficientes en la transmisión de peste durante la fase temprana (*X. cheopis*, *O. montana*, *O. hirsuta* y *O. tuberculata*) (USGS 2012).

Cuadro 2. Géneros de pulgas que son vectores naturales de *Y. pestis*

Familia	Género
Ceratophyllidae	<i>Aetheca</i>
	<i>Callopsylla</i>
	<i>Citellophilus</i>
	<i>Eumolpianus</i>
	<i>Malaraeus</i>
	<i>Nosopsyllus</i>
	<i>Opisocrostis</i>
	<i>Orchopeas</i>
	<i>Oropsylla</i>
	<i>Pleochaetis</i>
	<i>Thrassis</i>
Coptopsyllidae	<i>Coptopsylla</i>
Ctenophthalmidae	<i>Dinopsyllus</i>
	<i>Neopsylla</i>
	<i>Rhadinopsylla</i>
Leptopsyllidae	<i>Amphipsylla</i>
Pulicidae	<i>Hoplopsyllus</i>
	<i>Xenopsylla</i>
Pygiopsyllidae	<i>Stivalius</i>
Rhopalopsyllidae	<i>Polygenis</i>

**ESTUDIO MOLECULAR DE ESPECIES DE *BARTONELLA* Y *YERSINIA PESTIS*
EN PULGAS DE ROEDORES DE CHIHUAHUA, MEXICO.**

Molecular Survey of *Bartonella* Species and *Yersinia pestis* in Rodent Fleas (Siphonaptera) From Chihuahua, Mexico

Adriana M. Fernández-González,¹ Michael Y. Kosoy,² André V. Rubio,¹ Christine B. Graham,² John A. Montenieri,² Lynn M. Osikowicz,² Ying Bai,² Roxana Acosta-Gutiérrez,³ Rafael Ávila-Flores,⁴ Kenneth L. Gage,² and Gerardo Suzán^{1,5}

¹Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, Distrito Federal 04510, México (frogaf@gmail.com; andre.rubio@gmail.com; gerardosuz@gmail.com), ²Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 3150 Rampart Rd., Fort Collins, CO 80521 (mck3@cdc.gov; hyb4@cdc.gov; jam3@cdc.gov; vir5@cdc.gov; bby5@cdc.gov; klq0@cdc.gov), ³Museo de Zoología Alfonso L. Herrera Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México Distrito Federal, México (roxana_a2003@yahoo.com.mx), ⁴División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carr. Villahermosa-Cárdenas km. 0.5, Entronque a Bosques de Saloya, Villahermosa, Tabasco 86280, México (rafaelavilaf@yahoo.com.mx), and ⁵Corresponding author, e-mail: gerardosuz@gmail.com

Received 3 August 2015; Accepted 21 October 2015

Abstract

Rodent fleas from northwestern Chihuahua, Mexico, were analyzed for the presence of *Bartonella* and *Yersinia pestis*. In total, 760 fleas belonging to 10 species were tested with multiplex polymerase chain reaction analysis targeting the *gltA* (338-bp) and *pla* genes (478-bp) of *Bartonella* and *Y. pestis*, respectively. Although none was positive for *Y. pestis*, 307 fleas were infected with *Bartonella* spp., resulting in an overall prevalence of 40.4%. A logistic regression analysis indicated that the presence of *Bartonella* is more likely to occur in some flea species. From a subset of *Bartonella*-positive fleas, phylogenetic analyses of *gltA* gene sequences revealed 13 genetic variants clustering in five phylogroups (I–V), two of which were matched with known pathogenic *Bartonella* species (*Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* and *Bartonella washoensis*) and two that were not related with any previously described species or subspecies of *Bartonella*. Variants in phylogroup V, which were mainly obtained from *Meringis* spp. fleas, were identical to those reported recently in their specific rodent hosts (*Dipodomys* spp.) in the same region, suggesting that kangaroo rats and their fleas harbor other *Bartonella* species not reported previously. Considering the *Bartonella* prevalence and the flea genotypes associated with known pathogenic *Bartonella* species, we suggest that analysis of rodent and flea communities in the region should continue for their potential implications for human health. Given that nearby locations in the United States have reported *Y. pestis* in wild animals and their fleas, we suggest conducting larger-scale studies to increase our knowledge of this bacterium.

Key words: *Bartonella*, *Yersinia pestis*, flea, Mexico

Bartonella species and *Yersinia pestis* are vector-borne bacteria that multiply in the bloodstream of mammals and are important zoonotic pathogens (Stenseth et al. 2008, Chomel et al. 2009). The genus *Bartonella* currently includes between 30–40 species, from which some (*Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Bartonella bacilliformis*) are associated with specific human diseases such as trench fever, cat-scratch disease, and Carrion's disease (Jacomino et al. 2002, Kosoy et al. 2012, Buffet et al. 2013). These

bacteria can infect multiple mammals and ectoparasites are known to serve as vectors for at least some species of *Bartonella*, although the ability of many potential vectors has yet to be tested (Billeter et al. 2008, Chomel et al. 2009, Kosoy 2010). *Y. pestis* is a bacterium that is highly pathogenic for humans and many species of wildlife, especially certain rodent species. It is undoubtedly best recognized as the cause of three historical pandemics, including the Black Death in the 14th century (Stenseth et al. 2008). Nowadays,

it is present in a wide range of rodent hosts and their fleas, representing a constant threat to wildlife conservation and human health (Gage and Kosoy 2005, USGS 2012). The ecology of the flea-rodent interaction drives the dynamics of *Bartonella* species and *Y. pestis* (USGS 2012, Buffet et al. 2013). Because rodent fleas spread *Bartonella* bacteria among individual hosts, their relative host specificity shapes the level of *Bartonella* strain diversity observed in each host species (Tsai et al. 2011). Similarly, the abundance and intensity of fleas can determine the transmission rate of *Y. pestis* in prairie dogs (*Cynomys* species), which increases the mortality among these rodents and, under some circumstances, the infection risk in humans (Tripp et al. 2009).

In recent years, several studies have contributed to understand the importance of fleas as vectors of *Bartonella* species and *Y. pestis* in North America (Morway et al. 2008, Stapp et al. 2009, Tripp et al. 2009, Brinkerhoff et al. 2010a). For example, a field study in woodrats and their fleas conducted in New Mexico, USA, showed that flea abundance corresponded with high prevalence of *Bartonella* in fleas and woodrats during the early reproductive period of these rodents (Morway et al. 2008). Likewise, infestation with prairie dog fleas (*Oropsylla hirsuta*) increases in grasshopper mice following a plague epizootic, suggesting a change in host-specificity when the population of the main host suffers high mortality (Stapp et al. 2009).

The limited number of studies that have been conducted in rodent fleas (Zapata et al. unpublished) or wild rodents (Bai et al. 2009, Rubio et al. 2014) in Mexico indicates the presence of *Bartonella* in a wide range of rodent species and their fleas. In contrast, to date, no cases of *Y. pestis* infection have been documented in Mexican wild mammals. Research on both types of bacteria in northwestern Mexico becomes relevant, considering that this geographic region has similar biotic and abiotic conditions to those found in southwestern United States, where human cases of rodent-associated *Bartonella* illness (Kosoy et al. 2003, Iralu et al. 2006) and human plague (Craven et al. 1993) have been reported. Moreover, the southern limit of the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) distribution occurs in northwestern Mexico, where the species is considered threatened (Ceballos et al. 1993) because of natural droughts, habitat loss, and poisoning (Avila-Flores et al. 2012). Black-tailed prairie dogs are also known to be highly susceptible to *Y. pestis* (plague), and although plague has yet to be recognized in these animals in Mexico, black-tailed prairie dogs frequently succumb to the disease during outbreaks in the United States (Pauli et al. 2006).

In this study, we conducted a molecular survey of *Bartonella* species and *Y. pestis* in wild rodent fleas from northwestern Mexico. The identification of species (or taxon)-specific associations between rodents and fleas, as well as between fleas and bacteria, could provide new insights to understand the dynamics of *Bartonella* and plague infections in Mexico, where both zoonotic diseases appear to be rare, absent, or neglected.

Materials and Methods

Study Area and Sampling

We selected two locations (28 km apart) in the region of Janos, Chihuahua: Rancho Ojitos (RO, 30° 46'18.21" N, 108° 32'4.55" W) and Monteverde (MV: 30° 57'20.32" N, 108° 44'23.69" W) located within the Janos Biosphere Reserve. The first location is mostly covered by mesquite shrublands (*Prosopis* spp.), whereas the

latter is dominated by native desert grasslands, both with and without black-tailed prairie dogs colonies (*C. ludovicianus*), that intermix with mesquite shrublands.

In March 2013, we live trapped rodents in six sampling sites in each location. In each sampling site, we placed a grid of 7 × 7 Sherman traps (7 by 8 by 32 cm; H.B. Sherman traps, Tallahassee, FL) placed at 10-m intervals (3,600 m²). Trapping was conducted for three consecutive nights per site. In sites located within black-tailed prairie dog colonies, we additionally placed nine Tomahawk traps at the entrance of active burrows. Once captured, individuals were identified, weighed, sexed, and ear-tagged (Model 1005-3; National Band and Tag Co., Newport, KY). Each rodent was carefully inspected for 2 min to collect fleas, which were placed in microtubes containing 70% alcohol and stored at -80°C. After handling, rodents were released at the site of capture.

Identification and Relative Abundance of Fleas

Fleas were identified to species level based on morphological characters using a dissecting scope (SZx12 Olympus, Melville, NY), and published taxonomic keys (Hubbard 1947, Hopkins and Rothschild 1962, Stark 1970, Furman and Cats 1982, Acosta and Morrone 2003). We combined data from all plots in two locations to estimate the relative abundance of each flea species (number of individuals from a given species/total number of individuals), and the intensity of infestation (number of collected fleas from all species/number of infested hosts).

Template Preparation and PCR

Fleas were tested for *Bartonella* species and *Y. pestis* using a modified version of the multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay described by Stevenson et al. (2003). We placed each flea in 100 µl DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco, Grand Island, NY) with three 2.5-mmØ glass beads and ground it for 2 min at 20 beats/s in a Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK). Triturated samples were incubated at 95°C for 10 min and then centrifuged for 10 s at 5,000 rpm. We used 2.5 µl of the supernatant per PCR. Negative isolation controls were prepared by processing 100 µl DPBS (no flea) in tandem with each batch of fleas. Positive control template was prepared by diluting *Y. pestis* CO96-3188 DNA and *Bartonella doshiae* DNA in the supernatant from a colony-reared flea triturate (*Xenopsylla cheopis*, CDC, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, Fort Collins, CO) to final concentrations of 1 and 160 pg/µl, respectively.

To verify the presence of amplifiable DNA in each flea triturate, we prepared 50-µl reactions containing 1X GoTaq Green MasterMix and primers (500 nM each) designed to amplify a 213-bp segment of the 18S ribosomal RNA gene in fleas: Flea_1389F (5'-CGT ACT TTC CGG TAT CTC GAA-3) and Flea_1601R (5'-CTT TCG GCC AAG GAA AAC CT-3). We tested each sample for *Bartonella* species and *Y. pestis* in a second, 50-µl duplex PCR reaction containing 1X GoTaq Green MasterMix (Promega, Madison, WI) and 1.0 µM each primer. Primers pairs targeting *Bartonella* species and *Y. pestis* were described previously (Kosoy et al. 1997, Stevenson et al. 2003): BhCS781.p (5'-GGG GAC CAG CTC ATG GTG G-3) and BhCS1137.n (5'-AAT GCA AAA AGA ACA GTA AAC A-3) target the citrate synthase gene (*gltA*; 338-bp product); Yp1 (5'-ATC TTA CTT TCC GTG AGA AG - 3) and Yp2 (5'-CTT GGA TGT TGA GCT TCC TA - 3) target the plasminogen activator gene (*pla*; 478-bp product). Amplification included an initial

denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. Each set of reactions included a positive control (described above). Negative controls included an isolation control (described above) and DPBS.

Following PCR, we analyzed 10 µl of each sample by electrophoresis on a 1.5% agarose gel with SYBR Safe DNA gel stain (Life Technologies, Grand Island, NY). Samples were electrophoresed at 100 V for 1 h and amplicon bands were visualized using a BioSpectrum® Multispectral Imaging System (UVP, Upland, CA). We estimated amplicon size using a molecular weight standard (100 bp DNA ladder, New England BioLabs, Ipswich, MA). Only samples that ultimately produced unambiguous bands of the correct size were considered positive.

Sequence Analysis

Amplicons of the correct size ($n=48$) were randomly selected from the pool of individual fleas that were found to be *Bartonella*-positive. Based on this sampling procedure, we selected at least one individual flea from any combination of flea and rodent species (except *Thraxsis aridis* present in *Onychomys leucogaster*, and *Meringis altipecten* present in *Peromyscus maniculatus*). Selected amplicons were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and sequenced using an Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Analyses of sequences and phylogenetic relationships were conducted using MEGA5 (Tamura et al. 2011). Clustal W was used to align and compare our results with *Bartonella gltA* sequences obtained from GenBank. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method by the Kimura two-parameter distance method, and bootstrap calculation with 1,000 resamplings. A criterion of $\geq 96\%$ homology to *gltA* was used to define phylogroups (La Scola et al. 2003).

Statistic Analyses

We performed logistic regression analyses to identify variables that relate the presence of *Bartonella* in fleas. For this analysis, three models were performed, one with individual flea species (one variable, nine parameters), one with host species (host identity: one variable, nine parameters), and one with the two variables combined as explanatory variables. No interaction effects were included to avoid model overfitting. For individual design variables (either flea or host species), $P \leq 0.05$ were considered statistically significant. We evaluated overall performance of models using Akaike information criterion (AIC). The analyses were carried out in R software (R Development Core Team 2013).

Results

Rodent and Flea Communities

We captured a total of 198 rodents belonging to 10 species, seven genera, and three families (Cricetidae, Heteromyidae, and Sciuridae), from which 77.3% (153/198) had fleas (Table 1). We collected 760 fleas representing three families (Ceratophyllidae, Ctenophthalmidae, and Pulicidae), seven genera, and 10 species. The most abundant fleas were *M. altipecten*, *Meringis arachis*, and *Pleochaetis exilis*, whereas *T. aridis*, *Orchopeas sexdentatus*, and *Meringis parkeri* were less abundant (Table 2). The overall intensity of infestation was 4.9 (range: 1-40) fleas per individual (760/153).

Table 1. Number of rodents harboring fleas and number of rodents with fleas containing *Bartonella* DNA

Rodent species	Captured rodents	Number of rodents with fleas ^a	Number of rodents with fleas positive to <i>Bartonella</i>
<i>Chaetodipus penicillatus</i>	6	1	0
<i>Cynomys ludovicianus</i>	13	12	1
<i>Dipodomys merriami</i>	106	77	50
<i>Dipodomys spectabilis</i>	21	17	13
<i>Neotoma albigula</i>	1	1	1
<i>Onychomys arenicola</i>	17	17	16
<i>Onychomys leucogaster</i>	7	7	7
<i>Peromyscus leucopus</i>	4	4	2
<i>Peromyscus maniculatus</i>	15	12	9
<i>Spermophilus spilosoma</i>	8	5	0
Total	198	153	99

^a Rodent species with at least one flea collected.

Prevalence of *Bartonella* Species and *Yersinia pestis* in Fleas

We found an overall prevalence of 40.4% (307/760) of *Bartonella*-DNA-positive fleas. Every flea species tested yielded at least one positive, with the exception of *O. hirsuta*. We observed the highest prevalence in *P. exilis*, *M. altipecten*, and *M. arachis* (Table 2). All tested fleas were negative for *Y. pestis*.

Probability of *Bartonella* sp. Presence in Fleas

In total, 760 fleas belonging to 99 rodents were included in the model (Table 1). The AIC value indicated that flea species identity was the most important variable that predicts the presence of *Bartonella* (AIC_{flea} = 892.54, AIC_{host} = 930.84, AIC_{flea+host} = 893.59). The logistic regression model using flea species as the explanatory variable showed that the presence of *Bartonella* is more likely to occur in some flea species (*M. altipecten*, *M. arachis*, *O. sexdentatus*, *P. exilis*, *M. parkeri*, and *T. aridis*) than others (*E. gallinacea*, *O. hirsuta*, and *Pulex* sp.). In contrast, rodent host identity did not have a significant effect on *Bartonella* presence in fleas (Table 3; parameters of the combined model, which produced the lowest AIC value, are excluded).

Bartonella Genotypes in Fleas

Of the 48 amplicons selected, only 40 PCR products from rodent fleas were also found to be positive by the *gltA* screening. The obtained sequences clustered into 13 *Bartonella* genotypes. Of these variants, two were newly identified in the present study with GenBank accession numbers KM243758 and KM243759, and 11 were identical to previously reported genotypes. Genotypes were clustered into five phylogroups (I-V; Fig. 1): Group I was associated with *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* and comprised three genotypes associated with the fleas *P. exilis*, *M. parkeri*, and *O. sexdentatus* collected from the rodents *P. maniculatus*, *Onychomys arenicola*, *O. leucogaster*, and *Neotoma albigula*. All genotypes were identical to previously reported genotypes obtained from rodent hosts captured in Janos, Chihuahua, Mexico, and United States (KJ719284, DQ357613, and KJ719268). Group II clustered with *B. vinsonii* subsp. *anpensis*, and included two genotypes from *Orchopeas leucopus* fleas collected from *Peromyscus* rodents. One of these genotypes was identical to previously reported genotypes recovered from rodents of the same genus (GenBank AF489539 and AY064534).

Table 2. Flea abundances by rodent species and *Bartonella* sp. infection in fleas from the Janos region

Flea species	<i>Neotoma albigula</i>	<i>Onychomys arenicola</i>	<i>Onychomys leucogaster</i>	<i>Peromyscus leucopus</i>	<i>Peromyscus maniculatus</i>	<i>Chaetodipus hispidus</i>	<i>Dipodomys merriami</i>	<i>Dipodomys spectabilis</i>	<i>Cynomys ludovicianus</i>	<i>Spermophilus spilosoma</i>	No. collected	Relative abundance of fleas (%)	Infected fleas	Proportion of infected fleas (%)
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	1	1		1		1	8	15	1	28	56	7.4	1	0.3
<i>Pulex</i> sp.									17		17	2.2	1	0.3
<i>Meringis altiptecten</i>		34	19		2		189	3			247	32.5	108	35.2
<i>Meringis arachis</i>		11	5				17	111		1	145	19	55	18
<i>Meringis parkeri</i>		7	1				7				15	2	6	2
<i>Oropsylla hirsuta</i>									42		42	5.5	0	0
<i>Orchopeas leucopus</i>			1	11	25						37	4.9	9	3
<i>Orchopeas sexdentatus</i>	15										15	2	7	2.3
<i>Pleochaetis exilis</i>		140	33		10						183	24	118	38.4
<i>Thrassis aridis</i>			1					2			3	0.4	2	0.7
Total	16	195	60	12	37	1	224	133	60	29	760		307	

Table 3. Logistic regression analysis of two models

Model	Species	Estimated parameter	Standard error	p value	
Flea	<i>Echidnophaga gallinacea</i>	-4.007	1.009	<0.001*	
	<i>Pulex</i> sp.	1.235	1.442	0.392	
	<i>Meringis altiptecten</i>	3.755	1.017	<0.001*	
	<i>Meringis arachis</i>	3.515	1.023	<0.001*	
	<i>Meringis parkeri</i>	3.602	1.138	0.002*	
	<i>Oropsylla hirsuta</i>	-13.559	610.453	0.982	
	<i>Orchopeas leucopus</i>	2.872	1.079	0.008*	
	<i>Orchopeas sexdentatus</i>	3.874	1.134	0.001*	
	<i>Pleochaetis exilis</i>	4.604	1.021	<0.001*	
	<i>Thrassis aridis</i>	4.700	1.587	0.003*	
	Rodent	<i>Neotoma albigula</i>	1.631e+01	2.400e+03	0.995
		<i>Onychomys arenicola</i>	1.664e+01	2.400e+03	0.994
<i>Onychomys leucogaster</i>		1.704e+01	2.400e+03	0.994	
<i>Peromyscus leucopus</i>		1.547e+01	2.400e+03	0.995	
<i>Peromyscus maniculatus</i>		1.583e+01	2.400e+03	0.995	
<i>Chaetodipus hispidus</i>		-1.657e+01	2.400e+03	0.994	
<i>Dipodomys merriami</i>		1.645e+01	2.400e+03	0.995	
<i>Dipodomys spectabilis</i>		1.585e+01	2.400e+03	0.995	
<i>Cynomys ludovicianus</i>		1.249e+01	2.400e+03	0.996	
<i>Spermophilus spilosoma</i>		-5.295e-09	2.441e+03	1.000	

*P≤0.05.

while the other was new (GenBank KM243758). Group III included one genotype associated with *B. washoensis*. This was obtained from a *Pulex* flea collected from a black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*), and was identical to a previously reported genotype obtained from the rodents *O. leucogaster* (GenBank EF028160) and *Spermophilus tridecemlineatus* (GenBank AY584570), both of which were captured in United States. Group IV included four genotypes associated with fleas *M. altiptecten*, *M. arachis*, *M. parkeri*, and *P. exilis* collected from *Onychomys* spp. and *D. merriami*. Three of these genotypes were identical to those found in Janos, Chihuahua, Mexico, and United States in *Dipodomys* spp. and *O. leucogaster* (GenBank KJ719290, DQ357612, and KJ719294), whereas the other genotype is reported for the first time (GenBank KM243759). The closest *Bartonella* species to this Group was *B. grahamii* with 97.6–98.3% similarity. Group V included three genotypes not associated with previously described species of *Bartonella*; this clade was formed by sequences obtained mainly from fleas of kangaroo rats (*Dipodomys* spp.) and from some fleas of *Onychomys*

rodents. These genotypes were identical to those recently reported in *Dipodomys* spp. in Janos, Chihuahua, Mexico (GenBank KJ719296–KJ719298). Most infected fleas from the same individual host had the same *Bartonella* genotype, except for two fleas (*P. exilis*) collected from the same individual rodent (*O. leucogaster*) that had different genotypes. One of these fleas had a genotype clustered within Group I and the other had a genotype within Group IV.

Discussion

Our results indicated *Bartonella* strains are widely distributed in rodent fleas in northern Mexico, a finding that is consistent with a previous study that found a high prevalence and genetic diversity of *Bartonella* in wild rodents in the same region (Rubio et al. 2014). The overall prevalence of *Bartonella* species in fleas (~40%) from the Janos region was comparable with reports from other regions in North America (Stevenson et al. 2003, Morway et al. 2008, Billeter et al. 2011).

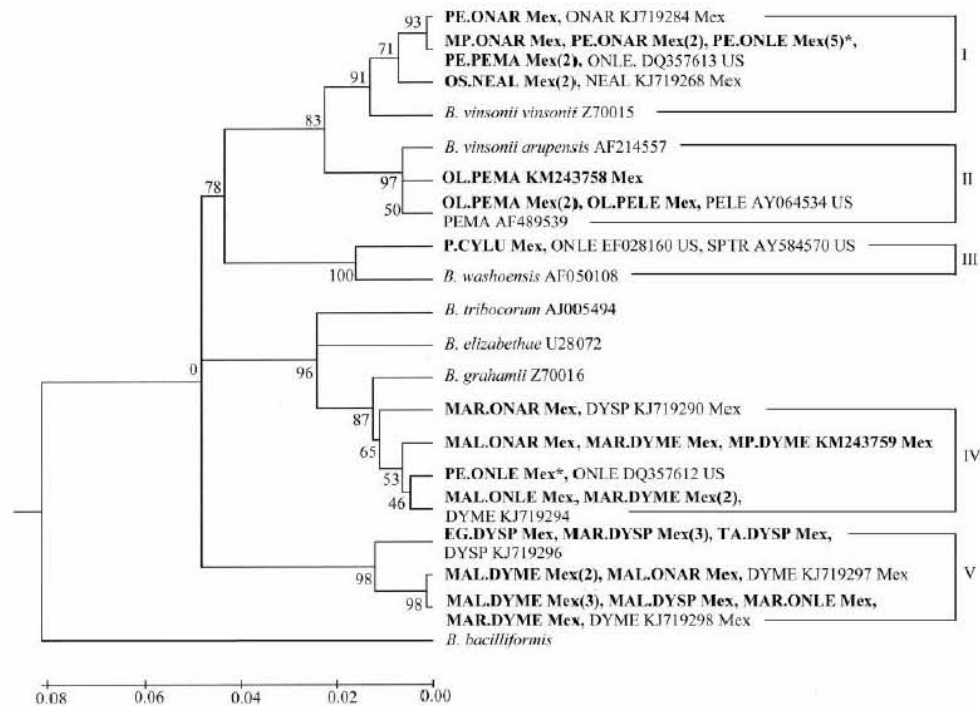


Fig. 1. Phylogenetic tree showing relationship of the *Bartonella* genotypes from field-collected rodent fleas from Janos, Mexico, and selected sequences of *gltA* obtained from the GenBank. Genotypes are indicated in boldface: first capital letters refer to flea species (EG = *E. gallinacea*, MAL = *M. altipecten*, MAR = *M. arachis*, MP = *M. parkeri*, OL = *O. leucopus*, OS = *O. sexdentatus*, P = *Pulex* sp., PE = *P. exilis*, and TA = *T. aridis*) and rodent species are represented with capital letters (CYLU = *C. ludovicianus*, DYME = *D. merriami*, DYSP = *D. spectabilis*, NEAL = *N. albigula*, ONAR = *O. arenicola*, ONLE = *O. leucogaster*, PERM = *P. maniculatus*, PERL = *P. leucopus*, and SPTR = *Spermophilus tridecemlineatus*). The numbers of genotypes assigned by flea species are in parentheses and the asterisk refers to sequences of different fleas collected from the same host but clustered at distinct phylogroup. Phylogroups are marked by roman numerals (I–V).

Results of this study suggest that the presence of *Bartonella* depends on the identity of flea species rather than that of host species. However, this result should be taken with caution, as specific host–vector and host–pathogen interactions may be required for the transmission and maintenance of this bacterium. For example, in a study focused on analyzing co-occurrence patterns of *Bartonella* strains both in fleas, *Polygenis guyni*, and their rodent hosts, *Sigmodon hispidus*, it was found that both vector and host harbored consistently one of the *Bartonella* strains; however, a common strain present in the rodent was absent in the fleas, whereas a rare strain in the rodent was common in the flea (Abbot et al. 2007).

Our phylogenetic analysis revealed that fleas in the study area are infected by a wide range of *Bartonella* strains. Of the three phylogroups associated with previously known *Bartonella*, Groups II (include genotypes from *O. leucopus*) and III (include only one genotype from *Pulex* sp.) were associated with *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, and *B. washoensis*, respectively, both of which are recognized as pathogenic to humans (Welch et al. 1999, Kosoy et al. 2003, Bai et al. 2012). These results are consistent with available information, as *O. leucopus* is specific to deer mice (*P. maniculatus*) and other species of *Peromyscus*, and deer mice have been recognized as carriers of *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, while *B. washoensis* is associated mainly with fleas of burrowing sciurid species (Stevenson et al. 2003, Brinkerhoff et al. 2010b, Inoue et al. 2011). Group V included genotypes isolated recently from kangaroo rats (*Dipodomys* spp.) in Mexico (Rubio et al. 2014), which indicates

that the specific fleas of *Dipodomys* spp. also harbor these genotypes. Because this novel genotype forms a separated branch in the phylogenetic tree of North American *Bartonella* (Rubio et al. 2014), both kangaroo rats and their fleas could harbor a distinct species of *Bartonella*.

The phylogenetic analysis showed a high degree of specificity between *Bartonella* genotypes and flea species, mainly at the genus level. Specificity of *Bartonella* is well-documented in rodents, and there is some indication that the same pattern could occur in rodent fleas (Kosoy et al. 1997, Bai et al. 2007, Morway et al. 2008, Chomel et al. 2009, Brinkerhoff et al. 2010b, Billeter et al. 2011, Buffet et al. 2013). We detected that two fleas from the same species and collected from the same individual host (*O. leucogaster*) were clustered separately, showing that fleas can harbor different *Bartonella* genotypes even if they parasitize the same host. This is not unusual, as these fleas were collected from *Onychomys* rodents, which tend to occupy other rodent burrows rather than building their own nests (Thomas 1988), facilitating the exchange of these bacteria between hosts and flea species (Bai et al. 2007). This result is consistent with a previous study conducted with rodent fleas from Japan, which reports that fleas *Ctenophthalmus congener truncus* are capable of harboring *B. grahamii* and *Bartonella taylorii* (Kabeya et al. 2011).

Human and animal plague cases and outbreaks reported in the U.S. southwest are associated with certain environmental conditions that often occur in March–June and October–May (Parmenter et al.

1999, Brown et al. 2010). We did not detect *Y. pestis* in any of the fleas collected in March. However, we collected flea species that have been naturally infected with this bacterium in the United States, including *O. hirsuta*, which has been recognized as an effective vector (Engelthaler et al. 1999, Tripp et al. 2009, USGS 2012). Recently, *O. hirsuta* has been found to be positive to *Y. pestis* in the neighbor state of New Mexico (Friggens et al. 2010), where the majority of human plague cases have been reported in the United States in the past 15 yr (Kiersten et al. 2015). It is therefore necessary to continue with studies of *Y. pestis* in the region, and to collect additional samples over larger spatial and temporal scales. Additional studies might also include wild carnivores, which are considered sentinels of plague (Salkeld and Stapp 2006), and could be important in spreading this bacterium between the United States and Mexico.

This is the first report of a molecular study of *Bartonella* species in fleas associated with wild rodents in the State of Chihuahua Mexico. Because some of the *Bartonella* genotypes we identified in fleas from this study have been associated with pathogenic strains that cause human illnesses, and some of the flea species collected have been found naturally infected with *Y. pestis* in nearby regions in the United States, we recommend further studies in this region.

Acknowledgments

We thank Ana L. Viguera Galván, Shira K. González Padrón, Paola Martínez Duque, Karen Moreno Ortiz, and Andrés M. López Pérez for the support during field collection. We acknowledge funding of CONACYT No. 179482, Cleveland Metroparks Zoo's Scott Neotropical Fund Program, CDC Global Diseases Detection program, and Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) of National Autonomous University of Mexico. Thanks to the Janos Grassland Biological Station, IE-UNAM for the accommodation during field collection. Fernández-González AM was supported by a scholarship of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). All procedures for trapping and handling rodents met the guidelines proposed by the American Society of Mammalogists (Sikes et al. 2011) and were approved by the animal care committee of the Universidad Nacional Autónoma de México and by the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Mexico (license no. FAUT-0250).

References Cited

- Abbot, P., A. E. Aviles, L. Eller, and L. A. Durden. 2007. Mixed infections, cryptic diversity, and vector-borne pathogens: Evidence from *Polygenis* fleas and *Bartonella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6045–6052.
- Acosta, R., and J. J. Morrone. 2003. Clave ilustrada para la Identificación de los Taxones Supraespecíficos de Siphonaptera de México. *Acta Zool. M.* 89: 39–53.
- Avila-Flores, R., G. Ceballos, A. de Villa-Meza, R. List, E. Marcé, J. Pacheco, G. A. Sánchez-Azofeifa, and S. Boutin. 2012. Factors associated with long-term changes in distribution of black-tailed prairie dogs in northwestern Mexico. *Biol. Conserv.* 161: 54–61.
- Bai, Y., M. Y. Kosoy, J. F. Cully, T. Bala, C. Ray, and S. K. Collinge. 2007. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 438–448.
- Bai, Y., M. Y. Kosoy, C. H. Calisher, J. F. Cully, and S. K. Collinge. 2009. Effects of rodent community diversity and composition on prevalence of an endemic bacterial pathogen - *Bartonella*. *Biodiversity* 10: 3–11.
- Bai, Y., M. Y. Kosoy, M. H. Diaz, J. Winchell, H. Baggett, S. A. Maloney, S. Boonmar, S. Bhengrui, P. Sawatwong, and L. F. Peruski. 2012. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* in Humans, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 989–991.
- Billeter, S. A., M. G. Levy, B. B. Chomel, and E. B. Breitschwerdt. 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med. Vet. Entomol.* 22: 1–15.
- Billeter, S. A., Gundi, M. P. Rood, and M. Y. Kosoy. 2011. Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 7850–7852.
- Brinkerhoff, R. J., S. K. Collinge, C. Ray, and K. L. Gage. 2010a. Rodent and flea abundance fail to predict a plague epizootic in black-tailed prairie dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10: 47–52.
- Brinkerhoff, R. J., H. Kabeya, K. Inoue, Y. Bai, and S. Maruyama. 2010b. Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals. *ISME J.* 4: 955–958.
- Brown, H. E., P. Ettestad, P. J. Reynolds, T. L. Brown, E. S. Hatton, J. L. Holmes, G. E. Glass, K. L. Gage, and R. J. Eisen. 2010. Climatic predictors of the intra- and inter-annual distributions of plague cases in New Mexico based on 29 years of animal-based surveillance data. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82: 95–102.
- Buffet, J. P., M. Kosoy, and M. Vayssier-Taussat. 2013. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future Microbiol.* 8: 1117–1128.
- Chomel, B. B., H. J. Boulouis, E. B. Breitschwerdt, R. W. Kasten, M. Vayssier-Taussat, R. J. Birtles, J. E. Koehler, and C. Dehio. 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet. Res.* 40: 29.
- Ceballos, G., E. Mellink, and L. R. Hanebury. 1993. Distribution and conservation status of prairie dogs *Cynomys mexicanus* and *Cynomys ludovicianus* in Mexico. *Biol. Conserv.* 63: 105–112.
- Craven, R. B., G. O. Maupin, M. L. Beard, T. J. Quan, and A. M. Barnes. 1993. Reported cases of human plague infections in the United States, 1970–1991. *J. Med. Entomol.* 30: 758–761.
- Engelthaler, D. M., K. L. Gage, J. A. Monteneri, M. Chu, and L. G. Carter. 1999. PCR detection of *Yersinia pestis* in fleas: Comparison with mouse inoculation. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1980–1984.
- Friggens, M. M., R. R. Parmenter, M. Boyden, P. L. Ford, K. Gage, and P. Keim. 2010. Flea abundance, diversity, and plague in Gunnison's prairie dogs (*Cynomys gunnisoni*) and their burrows in montane grasslands in northern New Mexico. *J. Wildl. Dis.* 46: 356–367.
- Furman, D. P., and E. P. Catts. 1982. *Manual of medical entomology*. Cambridge University Press, Cambridge, London.
- Gage, K. L., and M. Y. Kosoy. 2005. Natural history of plague: Perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 505–528.
- Hopkins, G. H. E., and M. Rothschild. 1962. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in British museum (Natural history) III: Hystriohopsyllidae (Acedestiinae, Anomiopsyllinae, Hystriohopsyllinae, Neopsyllinae, Rhadinopsyllinae, and Stenoponiinae). Cambridge University Press, London.
- Hubbard, C. A. 1947. Fleas of western North America: Their relation to public health. Iowa State College Press, Ames, IA.
- Inoue, K., H. Kabeya, K. Hagiya, M. Y. Kosoy, Y. Une, Y. Yoshikawa, and S. Maruyama. 2011. Multi-locus sequence analysis reveals host specific association between *Bartonella washoensis* and squirrels. *Vet. Microbiol.* 148: 60–65.
- Iralu, J., Y. Bai, L. Crook, B. Tempest, G. Simpson, T. McKenzie, and F. Koster. 2006. Rodent-associated *Bartonella* febrile illness, southwestern United States. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1081–1086.
- Jacomo, V., P. J. Kelly, and D. Raoult. 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 8–18.
- Kabeya, H., K. Inoue, Y. Izumi, T. Morita, S. Imai, and S. Maruyama. 2011. *Bartonella* species in wild rodents and fleas from them in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 1561–1567.
- Kiersten, J. K., J. E. Staples, A. F. Hinckley, K. L. Gage, and P. S. Mead. 2015. Epidemiology of human plague in the United States, 1900–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21: 16–22.
- Kosoy, M. Y. 2010. Ecological associations between bacteria of the genus *Bartonella* and mammals. *Biol. Bull.* 37: 716–724.
- Kosoy, M. Y., R. L. Regnery, T. Tzianabos, E. L. Marston, D. C. Jones, D. Green, G. O. Maupin, J. G. Olson, and J. E. Childs. 1997. Distribution,

- diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 578–588.
- Kosoy, M., M. Murray, R. D. Gilmore, Y. Bai, and K. L. Gage. 2003. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from human patient. *J. Clin. Microbiol.* 41: 654–650.
- Kosoy, M., D. T. Hayman, and K. S. Chan. 2012. *Bartonella* bacteria in nature: Where does population variability end and a species start? *Infect. Genet. Evol.* 12: 894–904.
- La Scola, B. Z. Zeaiter, A. Khamis, and D. Raoult. 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. *Trends Microbiol.* 11: 318–321.
- Morway, C., M. Kosoy, R. Eisen, J. Monteneri, K. Sheff, P. J. Reynolds, and N. Powers. 2008. A longitudinal study of *Bartonella* infection in populations of woodrats and their fleas. *J. Vector Ecol.* 33: 353–364.
- Parmenter, R. R., E. P. Yadav, C. A. Parmenter, P. Ettestad, and K. L. Gage. 1999. Incidence of plague associated with increased winter-spring precipitation in New Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 814–821.
- Pauli, N. J., S. W. Buskirk, E. S. Williams, and W. H. Edwards. 2006. A plague epizootic in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *J. Wildl. Dis.* 42: 74–80.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria.
- Rubio, V. A., R. R. Ávila-Flores, L. M. Osikowicz, Y. Bai, G. Suzán, and M. Y. Kosoy. 2014. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* strains in rodents from Northwestern Mexico. *Vector. Borne. Zoonotic Dis.* 12: 838–845.
- Sikes, R. S., and W. L. Gannon. 2011. Animal care and use committee of the American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.* 92: 235–253.
- Salkeld, D. J., and P. Stapp. 2006. Seroprevalence rates and transmission of plague (*Yersinia pestis*) in mammalian carnivores. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6: 231–239.
- Stapp, P., D. J. Salkeld, H. A. Franklin, J. P. Kraft, D. W. Tripp, M. F. Antolin, and K. L. Gage. 2009. Evidence for the involvement of an alternate rodent host in the dynamics of introduced plague in prairie dogs. *J. Anim. Ecol.* 78: 807–817.
- Stark, H. E. 1970. A revision of the flea genus *Thrassis* Jordan 1933 (Siphonaptera Ceratophyllidae) with observations on ecology and relationship to plague. University of California Press, Berkeley, CA.
- Stenseth, N. C., B. B. Atshabar, M. Begon, S. R. Belmain, E. Bertherat, E. Carniel, K. L. Gage, H. Leirs, and L. Rahalison. 2008. Plague: Past, present and future. *PLoS Med.* 5: e3.
- Stevenson, H. L., Y. Bai, M. Y. Kosoy, J. A. Monteneri, J. L. Lowell, and K. L. Gage. 2003. Detection of novel *Bartonella* strains and *Yersinia pestis* in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. *J. Med. Entomol.* 40: 329–337.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Thomas, R. E. 1988. A review of flea collection records from *Onychomys leucogaster* with observations on the role of grasshopper mice in the epizootology of wild rodent plague. *Great Basin Nat.* 48: 83–95.
- Tripp, D. W., K. L. Gage, J. A. Monteneri, and M. F. Antolin. 2009. Flea abundance on black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) increases during plague epizootics. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 313–321.
- Tsai, Y. L., C. C. Chang, S. T. Chuang, and B. B. Chomel. 2011. *Bartonella* species and their ectoparasites: Selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 299–314.
- (USGS) U.S. Department of the interior. 2012. Plague. USGS, Reston, VA.
- Welch, D. F., K. C. Carroll, E. K. Hofmeister, D. H. Persing, D. A. Robison, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner. 1999. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: Identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2598–2601.

DISCUSIÓN GENERAL

El interés por generar información acerca de los microorganismos que rodean al hombre surge a partir de la afectación que causan a este. Actualmente la emergencia y reemergencia de microorganismos patogénicos que comparten los mamíferos, incluyendo al hombre, ha aumentado, y el papel que juegan los vectores en la transmisión de estos se ha vuelto fundamental (Taylor et al. 2001; Jones et al. 2008).

La alta prevalencia de *Bartonella* sp. que se encontró (~40%) y el gran número de especies de pulgas que alojan esta bacteria, sugieren que *Bartonella* sp. está distribuida ampliamente en la región de la RBJ en Chihuahua. Este hallazgo es frecuente ya que en países como México, Estados Unidos, Tailandia y Corea, hay reportes de un 6% a un 95% de prevalencia en roedores y pulgas (Thiagarajan 2006; Morway et al. 2008; Billeter et al. 2011; Assarasakorn et al. 2012; Kim et al. 2013; Rubio et al. 2014).

Todas las especies de pulgas encontradas presentaron *Bartonella* sp., con excepción de la pulga *Oropsylla hirsuta* que es específica de perros de la pradera (*C. ludovicianus*), sin embargo, otras especies de pulgas como *Echidnophaga gallinacea* y *Pulex* sp., que también se encontraron en estos roedores fueron positivas en este estudio.

De las nueve especies de pulgas que resultaron positivas a *Bartonella* sp., dos no habían sido reportadas anteriormente como portadoras de *Bartonella* sp. en norte américa (*Meringis altipecten* y *Thrassis aridis*) (Friggens et al. 2010a; Thiagarajan et al. 2006; Zapata et al. 2012, Stevenson et al. 2003; Morway et al. 2008; Bitam et al. 2010; Brinkerhoff et al. 2010b). Esto es significativo ya que aporta información acerca de especies de pulgas que pueden ser vectores potenciales en la transmisión de *Bartonella* sp. en la región de la RBJ.

El análisis de regresión logística mostró que la variable (especie de pulga) es la que dicta la presencia de *Bartonella* sp. Si bien es evidente que las pulgas promueven la diversificación y dispersión de esta bacteria entre sus hospederos, estos también juegan un papel importante debido a que esta bacteria se replica en los eritrocitos de los hospederos (Chomel et al. 2009; Tsai et al. 2011). Por lo tanto, para que una especie de *Bartonella*

persista necesita adaptarse al vector y al hospedero por igual. Un ejemplo claro es el estudio realizado con roedores del género *Sigmodon* y sus pulgas (*Polygenis gwyni*).

En este estudio encontraron que una cepa previamente identificada como común en los roedores *Sigmodon* también es común en sus pulgas. Sin embargo, otra cepa que es común en estos roedores estuvo ausente en las pulgas *P. gwyni*, y viceversa, una cepa rara en los roedores fue bastante común en sus pulgas. Esto sugiere que las características biológicas de los hospederos y las pulgas pueden estar influyendo en la presencia de determinadas cepas de *Bartonella* (Abbot et al. 2007).

El análisis filogenético realizado reveló que se distribuyen al menos 13 variantes genéticas que se agruparon en cinco filogrupos, de los cuales dos están asociados a especies de *Bartonella* que resultan ser patogénicas para hombre, y uno sugiere ser una especie propia de ratas canguro (*Dipodomys* spp.) y sus pulgas. Esta información es relevante, pues las localidades en donde se encontraron estas cepas se encuentran cerca de asentamientos humanos. Sería interesante continuar con el estudio de esta bacteria haciendo estudios longitudinales en pulgas, roedores y humanos, para ver cómo se comporta esta bacteria en esta región.

Podemos sugerir que las colonias de perros de las praderas no estaban infectados con *Y. pestis*, ya que las pulgas específicas de estos roedores y que son competentes para la transmisión de esta bacteria no la presentaron. Sin embargo, la cercanía con las colonias de perros de las praderas (*C. ludovicianus*) que se han visto afectadas por esta bacteria en Estados Unidos, podría poner en riesgo las colonias de la RBJ, ya que algunos carnívoros son capaces de diseminar la bacteria debido al amplio ámbito hogareño que presentan. Por otro lado, esta información sirve de respaldo para futuros estudios.

CONCLUSIÓN

Este estudio permitió confirmar mediante estudios moleculares la presencia de distintas cepas de *Bartonella* en pulgas de roedores silvestres, y la ausencia de *Y. pestis* en las mismas pulgas. Además aportó información acerca de la riqueza de especies de pulgas y roedores que actualmente se distribuyen en la RBJ en Chihuahua. Es necesario continuar monitoreando ambas bacterias para prevenir futuros brotes en roedores y en la población humana.

REFERENCIAS

- Acosta, R. 2005.** Relación huésped-parásito en pulgas (Insecta: Siphonaptera) y roedores (Mammalia: Rodentia) del estado de Querétaro, México. *Fol. Entomol. Mex.* 44:37-47.
- Acosta, R., and J. J. Morrone. 2003.** Clave Ilustrada para la identificación de los taxones supraespecíficos de Siphonaptera de México. *Act. Zool. Mex. (nueva serie).* 89:39-53.
- Acosta-Guiterrez, R. 2014.** Biodiversidad de Siphonaptera en México. *Rev. Mex. Biodiv.* 85:345-352.
- Adjemian, J. Z., P. Foley, K. L. Gage and J. Foley. 2007.** Initiation and spread of traveling waves of plague, *Yersinia pestis*, in the western United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76:365-375.
- Assarasakorn, S., J. K. Veir, J. R. Hawley, M. M. Brewer, A. K. Morris, A. E. Hill, and M. R. Lappin. 2012.** Prevalence of *Bartonella* species, hemoplasmas, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. *Res in Vete Sci.* 93:1213-1216.
- Bitam, I., K. Dittmar, P. PAROLA, M. F. Whiting, and D. Raoult. 2010.** Fleas and flea-borne diseases. *J. Infect. Dis.* 14:e667-e676.
- Bitam, I., J. M. Rolain, V. Nicolas, Y. L. Tsai, P. Parola, V. A. K. B. Gundi, B. B. Chomel, and D. Raoult. 2012.** A multi-gene analysis of diversity of *Bartonella* detected in fleas from Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35:71-76.
- Brouqui, P., B. Lascola, V. Roux, and D. Raoult. 1999.** Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340:184-189.
- Brouqui, P., and D. Raoult. 2006.** Arthropod-borne diseases in homeless. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:223-35.

- Burroughs, A. L. 1947.** Sylvatic plague studies: the vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. J. Hyg. 45:371-396.
- Byam, W., and L. L. Lloyd. 1920.** Trench fever: its epidemiology and endemiology. R. Soc. Med. Proc.13:1-27.
- Candil, R. A., C. R. Romero, and Y. Y. Garcia. 2009.** El brote de peste en Mazatlán, Sinaloa, México (1902-1903). LAB-acta. 21:19-23.
- Carrillo, A. M. 2005.** ¿Estado de peste o estado de sitio?: Sinaloa y Baja California, 1902-1903. H Mex. 54:1049-1103.
- Carleton M. D., and G. G. Musser. 2005.** Rodentia. in D. E. Wilson y D. M. Reeder (eds.), Mammal Species of the World. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- (CONANP) 2006. Comisión Nacional de áreas naturales protegidas.** Estudio previo justificativo para el establecimiento del área natural protegida: Reserva de la Biósfera Janos Chihuahua, México. Distrito Federal.
- Dampf, A. 2010.** Palaeopsylla klebsiana n. sp. Ein fossiler Floh aus dem baltischen Bernstein. Schriften der Physikalisch-Okonomische Gesellschaft zu Koenigsberg in Preussen. 51:248-259.
- Eisen, R. J., S. W. Bearden, A. P. Wilder, J. A. Montenieri, M. F. Antolin, and K. L. Gage. 2006.** Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:15380-15385.
- Eisen, R. J., J. N. Borchert, J. L. Holmes, G. Amatre, K. V. Wyk, R. E. Enscore, N. Babi, L. A. Atiku, A. P. Wilder, S. M. Vetter, S. W. Bearden, J. A. Montenieri and K. L. Gage. 2008.** Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and their potential role as vectors in a plague-endemic region of Uganda. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78: 949-956.

- Eisen, R.J., L. Eisen, and K. L. Gage. 2009.** Studies of vector competency and efficiency of North American fleas for *Yersinia pestis*: state of the field and future research needs. *J Med Entomol Suppl* 2009; 46: 737-744.
- Eisen, R. J., J. L. Lowell, J. A. Montenieri, S. W. Bearden, and K. L. Gage. 2007b.** Temporal dynamics of early-secondary infectious feeds prolong efficient transmission by *Oropsylla montana* (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *J. Med. Entomol. Suppl.* 44:672-677.
- Eisen, R. J., A. P. Wilder, S. W. Bearden, J.A. Montenieri, and K. L. Gage. 2007a.** Early-phase transmission of *Yersinia pestis* and unblocked *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) is as efficient as transmission by blocked fleas. *J. Med. Ent.* 44:678-682.
- Engelthaler, D. M., B. J. Hinnebusch, C. M. Rittner, and K. L. Gage. 2000.** Quantitative competitive PCR as a technique for exploring flea-*Yersinia pestis* dynamics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 552-560.
- Faccini-Martínez, A. A., and H. A. Sotomayor. 2013.** Reseña histórica de la peste en Suramérica: una enfermedad poco conocida en Colombia. *Biomédica.* 33:8-27.
- Foil, L., E. Address, R. L. Freeland, A. F. Roy, R. Rutledge, P. C. Triche, and K. L. O'reilly. 1998.** Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. *J. Med. Ent.* 35:625-628.
- Fox, I. 1940.** Fleas of eastern United States. Ames: State College Press, Iowa, USA.
- Friggens, M. M. 2010a.** Fleas, hosts and habitat: what can we predict about the spread of vector-borne zoonotic diseases? Ph. D. dissertation, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Gage, K. L. 1998.** Plague. In L. Collier, A. Balows, and M. Sussman (eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial Infections*, vol. 3. Edward Arnold, London.

- Githeko, A. K., S. W. Lindsay, U. E. Confalonieri, and J. A. Patz. 2000.** Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull. World Health Organization*. 78:1136-1147.
- Gratz, N. 1999.** Rodent reservoirs and flea vectors of natural foci of plague, in *Plague manual*: World Health Organization.
http://www.who.int/csr/resources/publications/plague/WHO_CDS_CSR_EDC_99_2_EN/en/.
- Hsu, M. H., and W.J. Wu. 2000.** Effects of multiple mating on female reproductive output in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *Entomol. Soc. Amer.* 37:828-834.
- Jackson, L. A., B. A. Perkins, and J. D. Wegner. 1993.** Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am. J. Public. Health.* 1701-1711.
- Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman, and P. Daszak. 2008.** Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 451:990-994.
- Khokhlova, I.S., A. Hovhanyan, B. R. Krasnov, and A. A. Degen. 2007.** Reproductive success in two species of desert fleas: density dependence and host effect. *J. Exp. Biol.* 210:2121-2127.
- Kim, K.C. 1985.** Evolutionary relationship of parasitic arthropods and mammals, In K. C. Kim (eds.), *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*. Wiley, New York, USA.
- Koehler, J.E., C. A. Glaser, and J. T. Tappero.1994.** *Rochalimaea henselae* infection: a new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA.* 271:531-535.
- Koehler, J.E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero. 1997.** Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patient with bacillary angiomatosis-peliosis. *N. Engl. J. Med.* 337:1876-1883.

- Kosoy, M., D. T. S. Hayman, and K.S. Chan. 2012.** *Bartonella* bacteria in nature: Where does population variability end and a species start? *Infect. Genet. Evol.* 12: 894-904.
- Lewis, R. E. 1998.** Resume of the Siphonaptera (Insecta) of the world. *J. Med. Entomol.* 35:377–389.
- Lewis, R. E. 1997.** A pulicid flea in Miocene amber from Dominican Republic (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae). *Am. Mus. Novit.* 3205:1-9.
- Maggi, R. G., C. A. Harms, and E. B. Breitschwerdt. 2012.** Bartonellosis. In A. A. Aquirre, and P. Daszak (eds.), *new directions in conservation medicine, applied cases of ecological health.* Oxford University Press, New York, USA.
- Maguiña, V.C. 2010.** Bartonellosis o enfermedad de Carrión: nuevos aspectos de una vieja enfermedad. UNMSM Fondo Editorial. Lima, Perú.
- Maguiña, V. C., C. Ugarte-Gil, C. P. Breña, E. E. Ordaya, L. P. Ventosilla, E. Huaracaya, and C. C. Henriquez. 2008.** Actualización de la enfermedad de Carrión. *Rev. Med. Hered.* 19:36-41.
- Marshall, A. G. 1981.** *The ecology of ectoparasitic insects.* Academic Press, London.
- Medvedev, S. G. 1988.** Classification of fleas (Order Siphonaptera) and its theoretical foundations. *Entomol. Rev.* 78:1080-1093.
- Medvedev, S. G. 2000a.** Fauna and host-parasite associations of fleas (Siphonaptera) in different zoogeographical regions of the World: I. *Entomol. Rev.* 79:409-435.
- Medvedev, S. G. 2000b.** Fauna and host-parasite associations of fleas (Siphonaptera) in different zoogeographical regions of the World: II. *Entomol. Rev.* 79:409-435.
- Medvedev, S. G., and B.K. Kotti. 2013.** Host associations and origin in the formation of the Caucasian fauna of fleas (Siphonaptera). *Entomol. Rev.* 93:716-736.

- Morand, S, B. R. Krasnov, and R. Poulin. 2006.** Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management. S. Morand, B. R. Krasnov, and R. Poulin (eds.) Springer-Verlag Tokyo, New York, USA.
- Morales-Muciño, J. C., and J. Llorente-Bousquetes. 1986.** Estado actual del conocimiento de los Siphonaptera de México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología 2:497-554.
- Peus, F. 1968.** Über die beiden Bernstein-Flöhe (Insecta, Siphonaptera). Paläontologische Zeitschrift. 42:62-72.
- Perry, R. D. and J. D. Fetherston. 1997.** *Yersinia pestis*-Etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. 10:35-66.
- Ponce, H. and J. Llorente. 1996.** Siphonaptera. A. Llorente-Bousquets, A. García-Aldrete, and E. González-Soriano (eds.). Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis del conocimiento. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.
- Reeves, W. K., T. E. Rogers, L. A. Durden, and G. A. Dasch. 2007.** Association of *Bartonella* with the fleas (Siphonaptera) of rodents and bats using molecular techniques. J. Vector. Ecol. 32:118–22.
- Rothschild, M. 1975.** Recent advances in our knowledge of the order Siphonaptera. Annu. Rev. Entomol. 20:241-259.
- (SSA) Secretaría de Salud. 2001.** Programa de acción: Enfermedades transmitidas por vector. México, Distrito Federal.
- Silverman, J, and M. K. Rust. 1985.** Extended longevity of the pre-emerged adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) and factors stimulating emergence from the pupal cocoon. Ann Entomol. Soc. Am. 78:763-8.
- Taylor, L. H., S. M. Lathman, and E. J. Woolhouse. 2001.** Risk factors for human disease emergence. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 356:983-989.

- Thiagarajan, B. 2006.** Community dynamics of rodents, fleas and plague associated with black-tailed prairie dogs. Ph. D. dissertation, Kansas State University, Manhattan.
- Townsend, C. H. T. 1913.** The transmission of verruga by *Phlebotomus* 1913; 61:1717-1718.
- Traub, R. 1950.** Siphonaptera of Central America and Mexico: A morphological study of the aedeagus with descriptions of new genera and species. *Fieldiana Zoology* 1:1-127.
- Traub, R. 1972.** Notes on zoogeography, convergent evolution and taxonomy of fleas (Siphonaptera), based on collections from Gunung Benom and elsewhere in Southeast Asia. *Bull. British Mus. (Nat. Hist.). Zool.* 23:391-450.
- Vargas, M. F., R. Arenas, S. C. Baños, F. C. Valencia, and G. E. Torres. 2010.** Tularemia una revisión dermatológica. 8:110-116.
- Vega, L. C. A., R. A. Orzechowsky, A. R. Araiza, G. L. A. Ponce de León. 2010.** Enfermedad por arañazo de gato. A propósito del caso de un hombre de 32 años. *Med. Int. Mex.* 26:410-413.
- Wheelis, M. 2002.** Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg. Infect. Dis.* 8:971-975
- Whiting, M. F., A. S. Whiting, M. W. Hastriter, and K. Dittmar. 2008.** A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics.* 24: 677-707.
- (WHO) World Health Organization. 2007.** WHO Guidelines on Tularemia. Geneva, Switzerland.
- Zavala-Castro, J. E., J. E. Zavala-Velázquez, and U. J. E. Sulú. 2009.** Murine typhus in child, Yucatán, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 15:972-974.

Zietz, B. P., and H. Dunkelberg. 2004. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. Int. J. Hyg. Environ. Health. 207:165-178.

Zapata, C. 2012. Desarrollo del protocolo epidemiológico para la reintroducción de perritos de la pradera de cola negra (*Cynomys ludovicianus*) en el municipio de Santa Cruz, Sonora México, como modelo para los lineamientos de reintroducción de especies silvestres. M. S. thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.