



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Detección de *Bartonella* sp., en especies de  
*Lutzomyia* del noreste de México

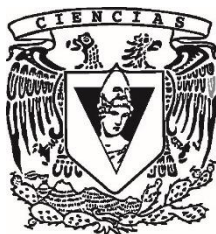
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA :

NADIA JOSELYNE SOTO OLGUÍN



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. INGEBORG BECKER FAUSER  
2016

**Ciudad Universitaria, CDMX**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno

Soto

Olguín

Nadia

Joselyne

55 1266 4604

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

309329013

2. Datos del tutor

Dra.

Ingeborg Dorothea

Becker

Fauser

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Miriam del Socorro

Berzunza

Cruz

4. Datos del sinodal 2

Dr.

César Antonio

Ríos

Muñoz

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Isabel Cristina

Cañeda

Guzmán

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Alicia

Rojas

Ascencio

7. Datos del trabajo escrito.

Detección de Bartonella sp., en especies de Lutzomyia del noreste de México

75 p.

2016

## **Agradecimientos**

El presente estudio se desarrolló con apoyo de los proyectos CONACYT No: 221405 “Estudio de la inflamación y citotoxicidad celular en Leishmaniasis: su asociación con la susceptibilidad y su proyección hacia un diseño de vacuna”, y PAPIIT No: IN217515, “Análisis de la inflamación y de células citotóxicas CD8 y NKT en leishmaniasis con proyección hacia la inmunoterapia”.

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser por brindarme el espacio, recursos, conocimientos y asesoría para realizar este estudio, y en lo personal, agradezco profundamente el haberme recibido en su laboratorio.

A la Dra. Miriam del Socorro Berzunza Cruz por orientarme en el uso de las técnicas que resultaron fundamentales para el desarrollo del trabajo experimental, y sobre todo, por la dirección de este proyecto como Co-tutora de la tesis.

Al Biól. Daniel Sokani Sánchez Montes, futuro Doctor, agradezco la inmensa paciencia que ha tenido para enseñarme a obtener e interpretar los resultados, además de otorgarme su apoyo técnico y académico durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Eduardo A. Rebollar Téllez por la colecta y procesamiento de los ejemplares que fueron utilizados en el presente trabajo de tesis, muchas gracias.

Al Dr. César Antonio Ríos Muñoz, por la asesoría recibida en la corrección final de la tesis y por las clases de redacción científica, ya que me permitieron corregir los errores de esta tesis y editar la información para su futura publicación en un artículo.

A la Dra. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por mostrarme el impresionante mundo de la parasitología durante las clases en la facultad y por facilitarme la información del trabajo de campo del presente trabajo de tesis.

A la M. en C. Alicia Rojas Ascencio, por sus valiosos consejos para mejorar el presente trabajo y así poder entregar una versión mejorada.

A todo el laboratorio de inmunoparasitología, compañeros de licenciatura y doctores, a los últimos agradezco el tiempo que me otorgaron durante la rotación de las diferentes áreas del laboratorio; y aunque no tuve la oportunidad de conocerlos adecuadamente, también agradezco el ejemplo que nos dan acerca de lo que implica el trabajo de un investigador: siempre dar lo mejor de sí mismos para buscar la verdad oculta en lo que nos rodea, jamás careciendo de imaginación, talento e inteligencia. Gracias.

A mi universidad, cuya excelencia académica y años de gran prestigio han tenido como resultado una innumerable cantidad de profesionistas; y entre ellos, a mis profesores de la Facultad de Ciencias, quienes representaron un verdadero apoyo para mí en estos años. A todos ustedes debo mi formación como Bióloga y les agradezco infinitamente por los conocimientos otorgados.

Teniendo en cuenta mi historia familiar, observando mis apellidos y mirando hacia atrás para conmemorar a todos los que me han antecedido:

No tuve el honor de conocer personalmente a mi abuelito materno, Ezequiel Olguín Salas (1933-1982), sin embargo, lo tengo presente por la memoria familiar. Por otra parte, recuerdo con afecto y respeto a quienes pude conocer y admirar, cuyas valiosas enseñanzas y ejemplo de valor y perseverancia conservaré toda la vida: mi abuelita materna Socorro Delgado Secundino (1938-2004) y mi abuelito Paterno, Isidro Soto Hernández (1933-2007). Siempre los tendré presente en todo momento, y aunque no sea una persona que siga una religión, sé que algún día los volveré a ver.

A mi abuelita paterna, María Elena García Muñoz: te agradezco inmensamente por los mejores recuerdos de mi infancia y todo el cariño que siempre me has brindado, la confianza y paciencia que tuviste en mí para apoyarme durante el curso de mi vida también ha sido sumamente importante para mí y lo agradeceré por siempre.

A mis padres, María de Lourdes Olguín Delgado y Agustín Nicolás Soto García: a ustedes les debo más que la vida, ha sido todo un camino de aprendizaje nunca carente de afecto y cariño por parte de ustedes, siempre procurándome todo lo que necesitaba, siempre realzando mis virtudes y aceptando mis defectos, sintiendo orgullo por mí, valorando mis logros aun cuando yo misma me negaba a hacerlo.

A mi hermana, Yolotzín Azaíd Soto Olguín: he aprendido mucho contigo y te debo bastante, eres de las pocas personas que entiende mi sentido del humor. Has estado conmigo desde que tengo memoria, y el simple hecho de separarme de ti fue bastante difícil, pero tenías que iniciar una etapa nueva y completamente maravillosa en tu vida junto a tu nueva familia.

A mi precioso sobrinito, Demian Aítor Romero Soto: desde que supe de tu existencia mejoraste mi vida por completo y la del resto de la familia que anhelaba tu llegada; formas parte de mi inspiración y motivación, siempre recuerda que, incluso antes de nacer, eres una de las personas que más he amado en la vida.

A mis tíos, primos, sobrinos y a las personas que me han acompañado en este tiempo de formación: por su ayuda, interés y palabras de aliento, me faltan las palabras para agradecerles lo que han hecho por mí.

Y por último, y no por eso menos importantes, la familia que elegí a lo largo de mi trayectoria escolar, mis amigos. Siempre tendré en mente a las personas que marcaron mi vida en la preparatoria y universidad con su inconfundible manera de ser, todos tan diferentes entre sí pero con algo en común: ustedes han logrado influir positivamente en mí en una variedad de formas que no podría describir en pocas palabras.

Difícilmente expreso mis sentimientos, pero jamás duden del gran aprecio que tengo por todos ustedes.

Gracias por una enseñanza de vida. Gracias por todo.

*“Aún no he muerto... amigo mío; ahora les toca a ustedes terminar la obra comenzada, siguiendo el camino que les he trazado...”*

Daniel Alcides Carrión, 05 de octubre de 1885.



## ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	0
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1) INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>1.1 Generalidades de <i>Bartonella</i></b> .....	2
<b>1.2 Referencias históricas</b> .....	2
1.2.1 Identificación de la primera especie de <i>Bartonella</i> .....	2
<b>1.3 Taxonomía</b> .....	4
1.3.1 Primera clasificación taxonómica.....	4
1.3.2 Clasificación taxonómica actual.....	5
<b>1.4 Vectores</b> .....	6
1.4.1 Vectores primarios y secundarios de <i>Bartonella</i> .....	6
1.4.2 El género <i>Lutzomyia</i> .....	8
<b>1.5 Hospederos</b> .....	9
<b>1.6 Ciclo de vida</b> .....	13
<b>1.7 Métodos de diagnóstico</b> .....	15
1.7.1 Inmunoensayos.....	15
1.7.2 Métodos moleculares: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	15
<b>1.8 Bartonelosis</b> .....	16
1.8.1 <i>Bartonella quintana</i> .....	16
1.8.2 <i>Bartonella bacilliformis</i> .....	17
1.8.3 <i>Bartonella henselae</i> .....	18
1.8.4 Potencial zoonótico de <i>Bartonella</i> .....	19
<b>ANTECEDENTES</b> .....	21
<b>2) JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>3) HIPÓTESIS</b> .....	23

<b>4) OBJETIVOS</b> .....	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares.....	23
<b>5) MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	24
5.1 Área de estudio.....	24
5.1.1 Colecta y procesamiento de diversas especies del género <i>Lutzomyia</i> .....	25
<b>5.2 Control positivo de extracción del DNA de <i>Lutzomyia</i></b> .....	26
<b>5.3 Verificación de la técnica de PCR para la detección de <i>Bartonella sp</i></b>	26
5.3.1 Prueba de especificidad.....	27
5.3.2 Prueba de sensibilidad.....	27
5.3.3 Amplificación del DNA de <i>Bartonella</i> en <i>Lutzomyia</i> .....	27
<b>5.4 Prevalencia de infección y análisis de secuencias</b> .....	28
<b>6) RESULTADOS</b> .....	29
<b>6.1 Control positivo de extracción del DNA de <i>Lutzomyia</i></b> .....	29
<b>6.2 Verificación de la técnica de PCR para la detección de <i>Bartonella sp</i></b> .....	30
6.2.1 Prueba de especificidad.....	30
6.2.2 Prueba de sensibilidad.....	31
6.2.3 Amplificación de <i>Bartonella</i> .....	32
<b>6.3 Análisis de secuencias</b> .....	33
6.3.1 Prevalencia de positivos a <i>Bartonella</i> .....	33
6.3.2 Alineamiento de secuencias.....	35
6.3.3 Análisis de distancias.....	36
<b>7) DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>8) CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>9) REFERENCIAS</b> .....	44



<b>10) APÉNDICE</b> .....	55
10.1 Trabajo de campo.....	55
10.1.1 Proceso curatorial para el montaje de los flebotominos.....	55
10.1.2 Extracción de DNA de <i>Lutzomyia</i> .....	58
10.1.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	59
10.2 Tabla 6. Relación de secuencias de especies de <i>Bartonella</i> utilizadas en el análisis filogenético y fenético (La Scola <i>et al.</i> , 2003).....	60
10.3 Tabla 7. Relación de secuencias de <i>Bartonella</i> sp., detectadas en diversos organismos (vectores y hospederos) de México.....	61
10.4 Tabla 8. Colecta realizada en Nuevo León, en los municipios de Santiago (-100.1418, 25.2254) y Cadereyta Jiménez (-99.5823, 25.2235).....	62
10.5 Tabla 9. Colecta realizada en el estado de Tamaulipas, municipio de Gómez Farías (-99.10163, 23.0417).....	63

## ABSTRACT

The genus *Bartonella* is composed of 33 species of Gram-negative bacteria transmitted by vectors —such as fleas, lice and phlebotomines— to various hosts either birds, reptiles and mammals, including humans, in which *Bartonella* can cause different clinical pictures or diseases, known as Bartonellosis. In Mexico, 150 cases of bartonellosis in humans have been reported in the states of Mexico and Chiapas, whose causal agent remains unknown. In Mexico City a case of bacillary angiomatosis and another case of cat scratch disease have been reported. Furthermore, *Bartonella* has been detected in rodents of Yucatan, in rodents and fleas of Chihuahua, in lice collected from people in Mexico City and in rodent lice from San Luis Potosi. However, there are no reports of *Bartonella* in vectors from other states of the Mexico. The present study aims at analyzing the genus *Lutzomyia* as a possible vector of *Bartonella* in the states of Nuevo León and Tamaulipas, Mexico.

In this study the detection of *Bartonella* was performed by amplification and sequencing of the citrate synthase gene (*gltA*) in *Lutzomyia* species collected in the states of Tamaulipas and Nuevo León. A phylogenetic analysis was elaborated and the prevalence of infection in the analyzed species of phlebotomines was determined. In the state of Nuevo León, 10 specimens were analyzed and *Bartonella* sp. was not detected, possibly due to the small sample size. In contrast, in the state of Tamaulipas 81 specimens were analyzed, of which 11 were positive (16.2%): three *Lutzomyia cruciata* and eight *Lutzomyia shannoni*. This is the first study in Mexico to report the presence of *Bartonella* sp. in *Lutzomyia* and the first worldwide to report sequences of *Bartonella* sp. in *Lu. shannoni* and *Lu. cruciata*. Furthermore, the phylogenetic analysis revealed a new lineage whose sequences are grouped with *Bartonella* species found in rodents. It should be noted that the species of *Lutzomyia* positive for *Bartonella* sp., have anthropophilic habits, which calls for further studies to evaluate the risk of transmission of this new lineage to humans.

## RESUMEN

El género *Bartonella* está compuesto por 33 bacterias Gram-negativas, se transmiten por vectores —como pulgas, piojos y flebotominos— a diversos hospederos, ya sean aves, reptiles y mamíferos, incluyendo seres humanos, en los que pueden provocar diferentes cuadros clínicos o enfermedades con características propias, conocidas como Bartonelosis. En México se han reportado 150 casos de bartonelosis en humanos en los estados de México y Chiapas, cuyo agente causal se desconoce. En la Ciudad de México se reportó un caso de angiomatosis bacilar y otro de la enfermedad del arañazo de gato. Así mismo, la presencia de *Bartonella* se ha detectado en roedores de Yucatán, en roedores y pulgas de Chihuahua, en piojos colectados de personas de la Ciudad de México y en piojos provenientes de roedores de San Luis Potosí. Sin embargo, no existen reportes de *Bartonella* en vectores de otros estados de la República Mexicana, por lo que el presente estudio representa una oportunidad para generar información del género *Lutzomyia* como posible vector de *Bartonella* en los estados de Nuevo León y Tamaulipas.

En este estudio se realizó la detección de *Bartonella* mediante la amplificación y secuenciación del gen de la citrato sintasa (*gltA*) en especies de *Lutzomyia* colectadas en los estados de Tamaulipas y Nuevo León. Posteriormente se elaboró un análisis filogenético y se determinó la prevalencia de infección en las especies analizadas de flebotominos. En el estado de Nuevo León se analizaron 10 ejemplares y no se detectaron positivos a *Bartonella* sp., posiblemente debido al escaso tamaño de muestra. En contraste, en el estado de Tamaulipas se analizaron 81 ejemplares, de los cuales 11 resultaron positivos (16.2%): tres *Lutzomyia cruciata* y ocho *Lutzomyia shannoni*. Este es el primer estudio en México en reportar la presencia de *Bartonella* sp. en *Lutzomyia* y el primero a nivel mundial en reportar secuencias de *Bartonella* sp. en *Lu. shannoni* y *Lu. cruciata*, las cuales representan un nuevo linaje agrupado con secuencias de especies de *Bartonella* encontradas en roedores mediante un análisis filogenético. Cabe destacar que las especies de *Lutzomyia* positivas para *Bartonella* sp. tienen hábitos antropofílicos, por lo que se necesitan estudios para conocer el riesgo de transmisión al humano de este nuevo linaje de *Bartonella*.

## **1) Introducción**

### **1.1 Generalidades de *Bartonella***

El género está compuesto por 33 especies y tres subespecies de bacterias Gram-negativas, número que no contempla a los “candidatos” que carecen de características para describirlos como especie (Buffet *et al.*, 2013). Algunas especies de *Bartonella* son móviles por poseer un flagelo o múltiples flagelos polares, mientras que el resto de las especies están cubiertas por pili (Garrity *et al.*, 2006). El pleomorfismo de estas bacterias se observa en frotis sanguíneos, por lo que el cambio de tamaño varía de 0.3-0.6 a 1.0-1.7  $\mu\text{m}$  entre su forma de cocobacilo y bacilo (Diddi *et al.*, 2013).

Son “organismos fastidiosos” por su crecimiento lento y sus requerimientos nutricionales complejos, ya sean medios de cultivo suplementados con 5% de sangre de caballo o conejo y  $\text{CO}_2$ . Requieren de 12 a 14 días para producir colonias visibles, aunque pueden llegar a tardar hasta 45 días. Una forma de reducir el tiempo en 3 a 5 días consiste en realizar sub-cultivos (Maurin *et al.*, 1994). Estas bacterias se transmiten por diversos vectores a un hospedero, incluyendo seres humanos, donde algunas especies de *Bartonella* pueden provocar enfermedades conocidas como bartonelosis (Garrity *et al.*, 2006).

### **1.2 Referencias históricas**

#### **1.2.1 Identificación de la primera especie de *Bartonella***

En 1901, Alberto Leonardo Barton Thompson (1871-1950) se graduó en Medicina con el siguiente título de tesis: “El gérmen patógeno de la enfermedad de Carrión” (Valdizán, 1925), en donde describió cuerpos extraños dentro de los eritrocitos en las muestras de sangre de pacientes con la “fiebre de Oroya” (cuadro clínico perteneciente a la enfermedad de Carrión, el otro cuadro clínico se le conoce como “verruca peruana”). Barton consideró que estos cuerpos eran el agente causante de la enfermedad de Carrión, por lo que fueron conocidos como “bacilos de Barton” (Cueto, 1996).

Años más tarde se argumentó que los “bacilos de Barton” eran alteraciones de los glóbulos rojos, por lo que no se trataba del agente causal de la enfermedad de Carrión (Schultz, 1968; Cueto, 1996). Barton reconoció su error, y en 1905 realizó un estudio con muestras de sangre de 14 pacientes afectados por la fiebre de Oroya (Cueto 1996). En la fase aguda, caracterizada por la presencia de fiebre y anemia, observó eritrocitos que contenían formas microscópicas alargadas, similares a las bacterias. Posteriormente observó formas redondeadas, y una vez que los pacientes se encontraban en la etapa de las lesiones cutáneas verrugosas, las formas microscópicas habían desaparecido por completo de los eritrocitos (Chatterjee *et al.*, 2014).

De esta manera, Barton anunció en 1909 el descubrimiento del agente causal de la enfermedad de Carrión. Esta vez, se aseguró de que los bacilos filamentosos que había identificado en la sangre de pacientes con fiebre de Oroya eran diferentes de cualquier otro organismo conocido. Señaló que los bacilos se multiplicaban en los enfermos, y que disminuían cuando los pacientes desarrollaban verrugas (Cueto, 1996).

Por lo tanto, dedujo que la fiebre de Oroya y la verruga peruana eran diferentes manifestaciones de la misma enfermedad (Schultz, 1968; Cueto, 1996). Sin embargo, sus observaciones no fueron aceptadas por los científicos locales, quienes argumentaron que se trataba de alteraciones en los eritrocitos. No fue hasta 1913 cuando el científico americano Richard Strong confirmó a los bacilos descubiertos por Barton como un nuevo organismo, el cual fue nombrado *Bartonella bacilliformis* en su honor (Cueto, 1996).

En 1920, Hideyo Noguchi, del Instituto Rockefeller, realizó un cultivo de *B. bacilliformis* a partir de tejidos provenientes de pacientes con fiebre de Oroya y verruga peruana. Después de inocular el cultivo de *B. bacilliformis* en monos, observó la aparición de síntomas relacionados con la fiebre de Oroya y verruga peruana, confirmando que el mismo agente etiológico provocaba ambos cuadros clínicos. Por lo tanto, la enfermedad de Carrión es la primera bartonellosis asociada al género *Bartonella*; y estudios posteriores permitieron identificar un mayor número de especies de *Bartonella* (Schultz, 1968; Cueto, 1996).

### 1.3 Taxonomía de *Bartonella*

#### 1.3.1 Primera clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del género *Bartonella* ha cambiado desde la descripción de la primera especie en 1913 (*B. bacilliformis*). Anteriormente, la familia *Bartonellaceae* contenía cuatro géneros: *Bartonella*, que albergaba a la única especie *B. bacilliformis*; *Eperythrozoon*; *Grahamella* y *Haemobartonella* (Peters & Wigand, 1955).

Las familias *Bartonellaceae*, *Rickettsiaceae* y *Chlamydozoaceae*, fueron clasificadas dentro del orden Rickettsiales por Breed, Murray y Hitchens (1948) en la sexta edición del manual de Bergey; adicionalmente, en 1957 la familia *Anaplasmataceae* fue agregada al orden Rickettsiales en la séptima edición de dicho documento (Storz & Page, 1971). Más adelante se excluyó a la familia *Chlamydozoaceae* del orden Rickettsiales debido al ciclo intracelular de desarrollo del género *Chlamydia*, conservando a las familias *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae*, y *Anaplasmataceae* (Weisburg *et al.*, 1989).

Posteriormente surgieron algunas discrepancias respecto a esta clasificación: los miembros del orden Rickettsiales se definieron como parásitos intracelulares obligados e inmóviles, que únicamente podrían crecer en sus hospederos o en tejidos vivos (Buchanan & Buchanan, 1938; Peters & Wigand, 1955). No obstante, miembros de los géneros *Grahamella*, *Rochalimaea* y *Bartonella* eran aptos para crecer en medios de cultivo (Brenner *et al.*, 1993). Y respecto a *B. bacilliformis*, era el único miembro móvil del orden Rickettsiales (Brenner *et al.*, 1991).

Del género *Grahamella* existían alrededor de 40 especies, mientras que *Rochalimaea quintana* y *Rochalimaea vinsoni* eran las únicas especies del género *Rochalimaea*, descritas en 1984; posteriormente fueron aisladas dos especies de fuentes humanas: *Rochalimaea henselae* y *Rochalimaea elizabethae*, descritas en 1992 y 1993 respectivamente (Brenner *et al.*, 1993).

Mediante un análisis de secuencias del gen 16S rRNA, se determinó que *Rochalimaea quintana* estaba más relacionada con *B. bacilliformis* que con los miembros de otros géneros de su propia familia, además, los géneros *Rochalimaea* y *Bartonella* estaban estrechamente relacionados con los miembros del subgrupo  $\alpha$ -2 de la clase Proteobacteria, especialmente la familia *Rhizobiaceae* (Brenner *et al.*, 1991).

Con base en estos hallazgos, las especies del género *Rochalimaea* fueron reclasificadas dentro del género *Bartonella*, y se sugirió retirar la familia *Bartonellaceae* (que contenía los géneros *Grahamella* y *Bartonella*) del orden Rickettsiales (Brenner *et al.*, 1993; Birtles *et al.*, 1995). Un estudio posterior eliminó el género *Grahamella*, reclasificando cinco especies dentro del género *Bartonella*: *Bartonella talpae*, *Bartonella peromysci*, *Bartonella grahamii* y *Bartonella taylorii* lo cual contribuyó a incrementar el número de especies de *Bartonella* conocidas (Birtles *et al.*, 1995).

### 1.3.2 Clasificación taxonómica actual:

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Bartonella***

<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Filo:</b>	Proteobacteria
<b>Clase:</b>	Proteobacteria alfa
<b>Orden:</b>	Rhizobiales
<b>Familia:</b>	Bartonellaceae
<b>Género:</b>	<i>Bartonella</i> Strong et al., 1913

La relación filogenética de *Bartonella* con otras Alfaproteobacterias indica que presenta una homología evolutiva con los miembros del género *Brucella*, *Agrobacterium*, y *Rhizobium*, los cuales están dentro del orden Rizobiales (Brenner *et al.*, 1993).

La Familia Bartonellaceae únicamente contiene al género *Bartonella*, y para la delimitación de las especies se utilizó la secuencia del gen 16S rRNA, obteniendo niveles de similitud superiores al 97.8%. Sin embargo, diversos estudios han revelado que las especies están estrechamente relacionadas al observarse niveles significativos de homología (16-67%) en la hibridación DNA-DNA (Brenner *et al.*, 1993; Birtles *et al.*, 1995). Por lo tanto, el análisis de secuencias del gen 16S rRNA no permite la medición de distancias filogenéticas con suficiente precisión para definir especies estrechamente relacionadas, como las especies del género *Bartonella* (Fox *et al.*, 1992; Stackebrandt & Goebel, 1994).

La comparación de secuencias de DNA dio como resultado la caracterización de diversos genes para la identificación de especies de *Bartonella*, tales como el gen RNAr 16S, el gen de la riboflavina sintasa (*ribC*), el gen de la chaperonina de choque térmico (*groEL*) o el gen de la proteína de división celular (*FtsZ*) (Houpikian & Raoult, 2001; Zeaiter *et al.*, 2002). No obstante, el gen que se utiliza con mayor frecuencia es el gen de la citrato sintasa (*gltA*), una secuencia con una tasa superior de evolución que permite estimar niveles de similitud más bajos entre especies estrechamente relacionadas. Esto permite generar estimaciones más confiables de la relación filogenética de las especies dentro del género *Bartonella* (Birtles & Raoult, 1996; La Scola *et al.*, 2003).

## **1.4 Vectores**

### **1.4.1 Vectores primarios y secundarios de *Bartonella***

Se define como vector al artrópodo que transmite un patógeno de un hospedero a otro. Se conocen como “vectores primarios” a los artrópodos implicados directamente en la transmisión de un patógeno; mientras que los “vectores secundarios” están involucrados ocasionalmente en la transmisión. Existe una diferencia importante entre un vector primario y un vector secundario: la documentación del vector primario se basa en estudios experimentales que demuestran la transmisión entre el vector y el hospedero, mientras que los vectores secundarios incluyen aquellos en los que se ha aislado o detectado un patógeno (Billeter *et al.*, 2008; Eldridge & Edman, 2012).



El papel de un vector es tanto cuantitativo como cualitativo, por lo que no es suficiente registrar la presencia de un patógeno en una población de artrópodos; más bien, debe describirse su participación en la transmisión de un agente infeccioso, proceso conocido como “incriminación de vectores” (DeFoliart *et al.*, 1987). Barnett (1962) proporcionó una descripción acerca de la incriminación de vectores de patógenos humanos, basándose en los postulados de Robert Koch (1843-1910) (Eldridge & Edman, 2012):

1.- Debe demostrarse que los miembros de la población de artrópodos se alimentan regularmente del hospedero portador del patógeno; de otra forma, los artrópodos deben tener contacto con el hospedero bajo condiciones naturales.

2.- Debe existir una asociación biológica convincente, en tiempo y espacio, entre el vector sospechoso y las infecciones clínicas o subclínicas en hospederos vertebrados.

3.- Los vectores, colectados bajo condiciones naturales, deben portar una etapa infectiva e identificable del patógeno.

4.- Un vector debe demostrar su capacidad de transmitir eficientemente al patógeno, lo cual se observará bajo condiciones experimentales.

Para el género *Bartonella*, los artrópodos que han demostrado ser vectores primarios incluyen los piojos de humano (*Pediculus humanus humanus* y *Pediculus humanus capitis*), pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*), pulgas de roedor (*Ctenophthalmus nobilis*) y flebotominos (*Lutzomyia verrucarum*) (Tsai *et al.*, 2011).

Actualmente, un número creciente de especies de *Bartonella* se han aislado o detectado en múltiples artrópodos, como pulgas (*Pulex irritans*), dípteros (*Lipoptena cervi* y *Lipoptena mazamae*), y ácaros, en particular diversos géneros de garrapatas (*Ixodes* sp., *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp., *Haemaphysalis* sp.) (Tabla 2). Sin embargo, el papel de estos organismos como vectores permanece sin conocerse, por lo que su capacidad para transmitir diferentes especies de *Bartonella* aún no se descarta. Esto podría tener un impacto en el número de hospederos que podrían infectar, incluyendo al ser humano (Halos *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2013).

### 1.4.2 El género *Lutzomyia*

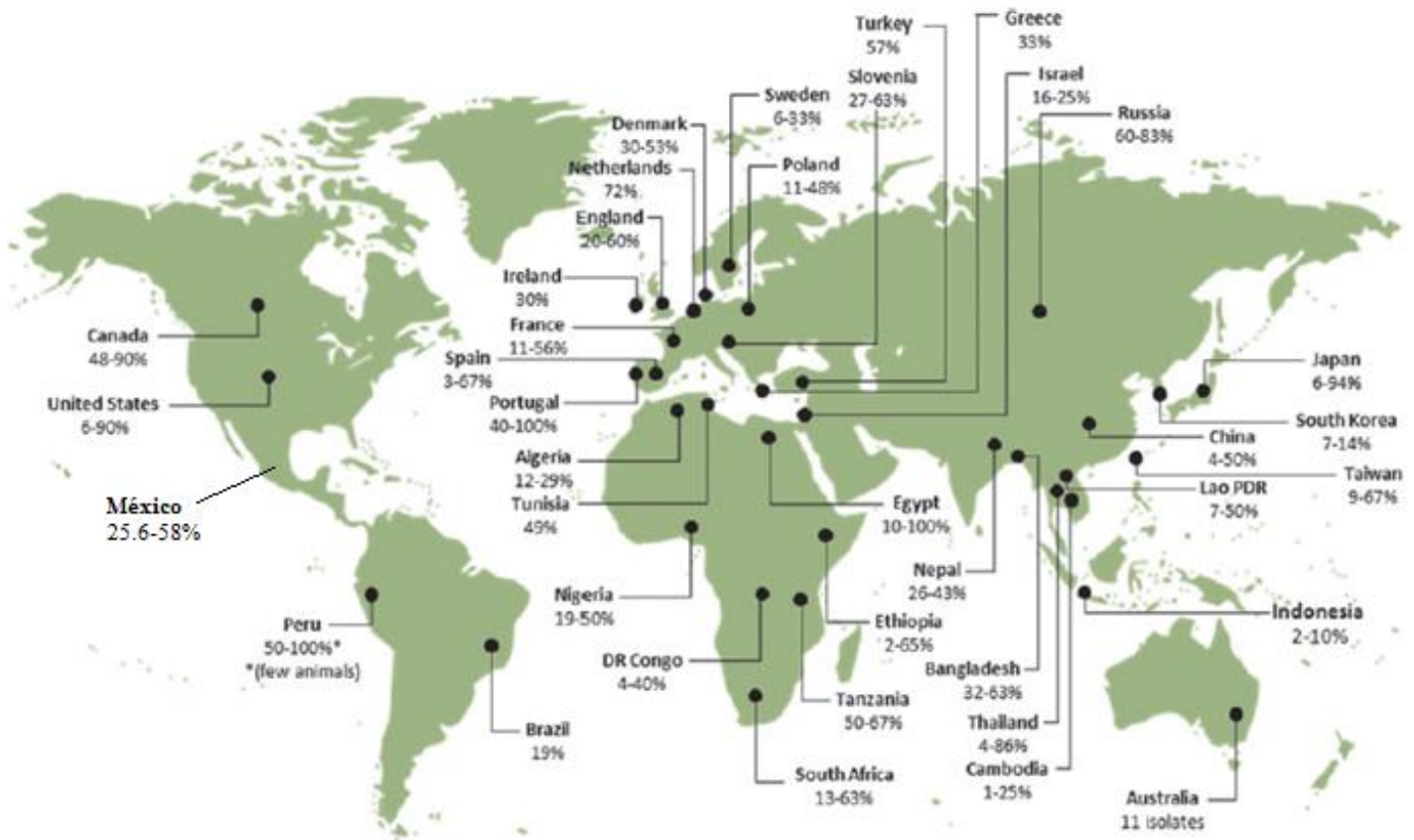
El género *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) contiene alrededor de 380 especies. Se conocen en ciertas regiones de México bajo nombres como "jejenes" o "papalotillas" (Godínez-Álvarez, Ibáñez-Bernal, 2000); rara vez exceden los 3.5 mm de longitud, tienen patas delgadas y su cuerpo está cubierto por sedas, la venación de sus alas es paralela y al estar en reposo las mantienen en un ángulo de 60° (Maroli *et al.*, 2013). La mayoría de las especies suelen pasar desapercibidas porque sólo se encuentran en microambientes muy particulares, como los agujeros de los troncos de los árboles, cuevas o nidos (Young & Duncan, 1994). No obstante, la distribución de algunas especies puede ser muy amplia debido a su capacidad de adaptación a diversos ambientes (Service, 1980). *Lutzomyia* transmite a los seres humanos ciertas especies de protozoarios del género *Leishmania* (Tripanosomatida: Tripanosomatidae), virus como *Phlebovirus* y bacterias como *B. bacilliformis* (agente causal de la enfermedad de Carrión) (Ready, 2013).

La primera vez que se propuso a *Lutzomyia* como vector de *B. bacilliformis* fue en el estudio realizado por Noguchi *et al.* (1929), en donde se examinó un largo número de artrópodos de zonas endémicas de la verruga peruana mediante homogeneización de los ejemplares, inyección en monos (*Macacus rhesus*) y posterior aislamiento del patógeno (cultivo de la sangre de los monos en medios enriquecidos); se encontró que *Phlebotomus verrucarum* (ahora *Lutzomyia verrucarum*) junto con dos especies recién descritas en ese tiempo, *Phlebotomus peruensis* (ahora *Lutzomyia peruensis*) y *Phlebotomus noguchi* (ahora *Lutzomyia noguchi*) podían infectar a los monos con *B. bacilliformis* (Minnick *et al.*, 2014).

Entre las especies anteriores se destaca *Lu. verrucarum*, la cual es conocida por alimentarse preferentemente de humanos y por ingresar a las viviendas; por lo tanto, esta especie fue propuesta como el principal vector de *B. bacilliformis* para la mayor parte de zonas endémicas de Perú (Chomel *et al.*, 2009). Y para observar su capacidad como vector, en un estudio se observó la colonización de *B. bacilliformis* en *Lu. verrucarum*, la cual se presentaba hasta por dos semanas, mientras que la misma bacteria no logró establecerse en *Lu. longipalpis* por más de siete días (Battisti *et al.*, 2015).

## 1.5 Hospederos

El uso de marcadores moleculares ha facilitado el estudio del género *Bartonella* en mamíferos, observándose una amplia distribución a nivel mundial en diferentes hospederos (Breitschwerdt & Kordick, 2000; Kosoy *et al.*, 2012). No obstante, los estudios se han enfocado en roedores, cuyas prevalencias varían notablemente en países como Estados Unidos (6-90%), Rusia (60-83%) y Portugal (40-100%) a comparación de países como Brasil (19%) y Corea del Sur (7-14%) (Gutiérrez *et al.*, 2015). Además, el género *Bartonella* es más frecuente en roedores de entornos naturales que en sitios urbanos (Kosoy *et al.*, 2010) (Fig.1).



**Figura 1.** Rango de tasas de infección por *Bartonella* en roedores a nivel mundial (modificado de Gutiérrez *et al.*, 2015).

El DNA de *Bartonella* se ha detectado en reptiles como la tortuga caguama (*Caretta caretta*) (Valentine *et al.*, 2007); en aves como el ceniztonle (*Mimus polyglottos*), el tordo sargento (*Agelaius phoeniceus*), el carpintero de vientre rojo (*Melanerpes carolinus*) y el colimbo grande (*Gavia immer*) (Mascarelli *et al.*, 2014); en mamíferos marinos como el delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), el delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), el delfín gris (*Grampus griseus*), el cachalote enano (*Kogia breviceps*) (Harms *et al.*, 2008) y la marsopa común (*Phocoena phocoena*) (Maggi *et al.*, 2005); y en una amplia variedad de mamíferos terrestres, incluyendo al ser humano (Kaiser *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2013).

En los mamíferos terrestres infectados con *Bartonella* es común observar bacteremia (presencia de bacterias en la sangre). Por otro lado, las manifestaciones de la infección pueden ser mínimas o incluso imperceptibles (Chomel *et al.*, 2003). Sin embargo, en los cánidos (perros domésticos, coyotes y zorros grises) se encuentra frecuentemente *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*, la cual se ha identificado como una causa de endocarditis (inflamación del revestimiento interno del endocardio) y ha sido asociada con arritmias (falta de regularidad o alteración de la frecuencia de los latidos del corazón) y miocarditis (inflamación del miocardio) (Breitschwerdt *et al.*, 1999; Chomel *et al.*, 2009).

La detección de ciertas especies de *Bartonella* ocurren con mayor frecuencia en determinado tipo de hospedero, por ejemplo, las siguientes especies se han asociado a roedores: *Bartonella taylorii*, *Bartonella doshiae*, *Bartonella silvatica*, *Bartonella rochalimae*, *Bartonella rattimassiliensis*, *Bartonella rattaaustraliani*, *Bartonella queenslandensis*, *Bartonella phoceensis*, *Bartonella pachyuromydis*, *Bartonella japonica*, *Bartonella jaculi*, *Bartonella coopersplainsensis*, *Bartonella callosciuri*, *Bartonella birtlesii*, *Bartonella acomydis*, *Bartonella vinsonii subsp. vinsonii*; *Bartonella grahamii*, *Bartonella elizabethae*, *Bartonella tribocorum*, *Bartonella vinsonii subsp. arupensis*, *Bartonella washoensis* y *Bartonella tamiae*. Por lo tanto, se ha sugerido que existe una asociación entre diversos tipos de hospederos y diferentes especies de *Bartonella* (Buffet *et al.*, 2013) (Tabla 2).

La asociación con los gatos se ha observado en *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella henselae* y *Bartonella koehlerae* (Heller *et al.*, 1997; Chomel *et al.*, 2009). Sin embargo, la asociación al mismo hospedero no asegura que las especies de *Bartonella* estén estrechamente relacionadas, como es el caso de *B. henselae* y *Bartonella koehlerae*, las cuales parecen estar estrechamente relacionadas entre sí mientras que *B. clarridgeiae* es muy distante filogenéticamente a esas especies (Kosoy *et al.*, 2012).

*B. bacilliformis* únicamente se ha encontrado en seres humanos, y algunas poblaciones nativas de los Andes pueden desarrollar una infección cutánea benigna con esta especie, lo que puede provocar bacteremia (presencia de bacterias en la sangre) hasta en el 10% de la población (Chomel *et al.*, 2003). *Bartonella quintana* se consideraba exclusiva del ser humano, sin embargo, se ha detectado en gatos (La VD *et al.*, 2005) y en pulgas de gato (*C. felis*) (Rolain *et al.*, 2003).

**Tabla 2.** Asociación de especies de *Bartonella* con sus hospederos y vectores.

Especie	Hospedero	Vector	Enfermedades en humanos	Referencias
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Lutzomia verrucarum</i>	Enfermedad de Carrión (fiebre de Oroya, verruga peruana)	Billemeter <i>et al.</i> , (2008) Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. quintana</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Pediculus humanus humanus</i> , <i>Pulex irritans</i> .	Fiebre de las trincheras, endocarditis, angiomatosis bacilar	Billemeter <i>et al.</i> , (2008) Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. alsatica</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Desconocido	Endocarditis, linfadenitis	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. clarridgeiae</i>	<i>Felis catus</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Enfermedad del arañazo de gato	Billemeter <i>et al.</i> , (2008) Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. elizabethae</i>	<i>Rattus spp.</i> , <i>Bandicota spp.</i> , <i>Mus spp.</i> , <i>Tatera leucogaster</i> , <i>Meriones shawi</i> , <i>Saccostomus campestris</i> , <i>Arvicanthus spp.</i> , <i>Praomys spp.</i> , <i>Grammomys spp.</i> , <i>Aethomys namaquensis</i>	<i>Xenopsylla cheopis</i> , <i>Xenopsylla ramesis</i> , <i>Rhipicephalus microplus</i>	Endocarditis, neuroretinitis	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. grahamii</i>	<i>Apodemus spp.</i> , <i>Myodes spp.</i> , <i>Microtus spp.</i> , <i>Mus spp.</i> , <i>Rattus spp.</i>	<i>Ctenophthalmus nobilis nobilis</i>	Neuroretinitis	Billemeter <i>et al.</i> , (2008) Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. henselae</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> y <i>Felis catus</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Endocarditis, angiomatosis bacilar, Enfermedad del arañazo de gato	Billemeter <i>et al.</i> , (2008)
<i>B. koehlerae</i>	<i>Felis catus</i>	Desconocido	Endocarditis	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. rochalimae</i>	<i>Rattus spp.</i> , <i>Myodes glareolus</i> , <i>Apodemus spp.</i> , <i>Vulpes vulpes</i> , <i>Procyon lotor</i> , <i>Canis latrans</i>	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Bacteremia, fiebre	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. tamiiae</i>	¿ <i>Rattus spp?</i>	<i>Haemophysalis spp.</i> , <i>Leptotrombidium spp.</i>	Bacteremia, fiebre	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)

<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Arupensis</i>	<i>Peromyscus</i> spp., <i>Onychomys</i> spp.	<i>Oropsylla hirsuta</i> , <i>Aetheca wagneri</i> , <i>Orchopeas leucopus</i>	Bacteremia, fiebre, endocarditis	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Berkhoffii</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	¿Garrapatas?	Endocarditis	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. washoensis</i>	<i>Tamias</i> spp., <i>Spermophilus</i> spp., <i>Cynomys</i> spp.	<i>Oropsylla hirsuta</i> , <i>Aetheca wagneri</i> , <i>Orchopeas leucopus</i>	Miocarditis, endocarditis	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. birtlesii</i>	<i>Apodemus</i> spp. <i>Myodes glareolus</i>	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011) Buffet <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. bovis</i> (= <i>B. weissii</i> )	<i>Bos primigenius taurus</i> , <i>Felis catus</i>	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. capreoli</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. chomeolii</i>	<i>Bos primigenius taurus</i>	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. doshiae</i>	<i>Apodemus</i> spp. <i>Myodes glareolus</i> , <i>Microtus agrestis</i> , <i>Sigmodon hispidus</i>	<i>Polygenis gwyni</i>	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. peromysci</i>	<i>Mus</i> spp.	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. phoceensis</i>	<i>Rattus</i> spp.	<i>Polyplax spinulosa</i>	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. rattimassiliensis</i>	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Suncus murinus</i> <i>Mus</i> spp.	<i>Polyplax spinulosa</i> , <i>Haemophysalis longicornis</i> , <i>Hoplopleura pacifica</i>	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. schoenbuchensis</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. talpae</i>	<i>Arvicola</i> spp.	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. taylorii</i>	<i>Apodemus</i> spp., <i>Myodes</i> spp., <i>Microtus</i> spp.	<i>Ctenophthalmus nobilis nobilis</i>	Desconocido	Billemeter <i>et al.</i> , (2008)
<i>B. tribocorum</i>	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Mus</i> spp., <i>Aethomys namaquensis</i> , <i>Meriones shawi</i> , <i>Arvicanthis</i> spp., <i>Praomys</i> spp., <i>Grammomys</i> spp.	<i>Polyplax spinulosa</i> , <i>Xenopsylla cheopis</i>	Episodio febril en humanos de Tailandia	Kaiser <i>et al.</i> , (2011) Kosoy <i>et al.</i> , (2010)
<i>B. florencae</i>	<i>Crocidura russula</i>	Desconocido	Desconocido	Mediannikov <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Vinsonii</i>	<i>Neotoma</i> spp., <i>Myodes gapperi</i> , <i>Microtus pennsylvanicus</i>	Desconocido	Desconocido	Kaiser <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. silvatica</i>	<i>Apodemus argenteus</i> <i>Apodemus speciosus</i>	Desconocido	Desconocido	Inoue <i>et al.</i> , (2010)
<i>B. japónica</i>	<i>Apodemus speciosus</i>	Desconocido	Desconocido	Inoue <i>et al.</i> , (2010)
<i>B. jaculi</i>	<i>Jaculus orientalis</i>	Desconocido	Desconocido	Sato <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. callosciuri</i>	<i>Callosciurus notatus</i>	Desconocido	Desconocido	Sato <i>et al.</i> , (2013) Buffet <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. pachyuromydis</i>	<i>Pachyuromys duprasi</i>	Desconocido	Desconocido	Sato <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. acomydis</i>	<i>Acomys russatus</i>	Desconocido	Desconocido	Sato <i>et al.</i> , (2013) Buffet <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. cooperiplainsensis</i>	<i>Rattus</i> spp.	<i>Stephanocircus pectinipes</i>	Desconocido	Buffet <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. queenslandensis</i>	<i>Rattus</i> spp., <i>Bandicota</i> spp., <i>Suncus murinus</i> , <i>Mus</i> spp., <i>Arvicanthis</i> spp., <i>Praomys</i> spp., <i>Grammomys</i> spp.	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Desconocido	Buffet <i>et al.</i> , (2013)
<i>B. rattaustaliani</i>	<i>Melomys</i> spp., <i>Rattus</i> spp.	<i>Stephanocircus dasyure</i>	Desconocido	Buffet <i>et al.</i> , (2013)

## 1.6 Ciclo de vida

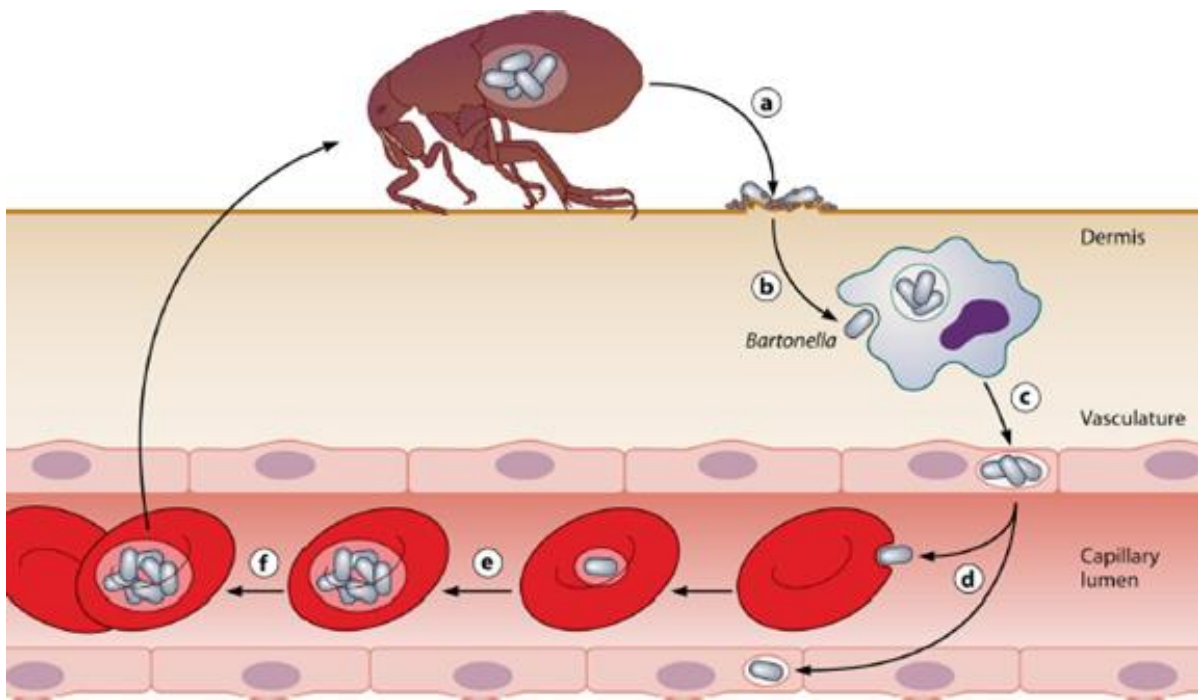
El ciclo de infección de las especies de *Bartonella* presenta ciertas diferencias relacionadas al tipo de vector y hospedero involucrado. Sin embargo, el concepto general del ciclo se conserva entre los miembros del género *Bartonella*, lo cual es necesario para su supervivencia, ya que permite la replicación de un organismo, que tiene un crecimiento extremadamente lento, en un compartimento protegido contra el sistema inmune, dando como resultado una infección persistente (Harms & Dehio, 2012).

El estudio del ciclo de vida de *Bartonella* en mamíferos reporta dos formas de transmisión: una involucra el ingreso de la bacteria al hospedero mediante la mordida o arañazo de un animal infectado, lo cual se ha observado en la transmisión de *B. henselae* de gatos o perros hacia seres humanos (Keret *et al.*, 1998). Sin embargo, la transmisión habitual al hospedero ocurre a través de un vector hematófago (pulgas, piojos, garrapatas, flebotominos). Si la bacteria está presente en las heces de las pulgas, se transmite a través de una lesión en la piel (Siamer & Dehio, 2015). También podría transmitirse durante la alimentación de flebotominos y garrapatas, aunque faltan estudios para corroborarlo (Reis *et al.*, 2011; Harms & Dehio, 2012).

Una vez dentro del hospedero, la bacteria infecta un “nicho celular primario”, y aunque no hay evidencia contundente, las células progenitoras hematopoyéticas, las células epiteliales y las células endoteliales son los mejores candidatos (Harms & Dehio, 2012). Adicionalmente se ha propuesto que las células dendríticas (Siamer & Dehio, 2015) y los macrófagos podrían transportar a la bacteria y promover la difusión del patógeno (Kodrick *et al.*, 1999; Harms & Dehio, 2012).

La entrada de *B. henselae* en células endoteliales humanas se puede producir a través de dos vías: la primera implica la formación de un “invasoma”, es decir, grandes agregados bacterianos (Dehio *et al.*, 1997). Y la segunda vía involucra el ingreso de bacterias individuales en vacuolas, algo que también se describe en *B. bacilliformis* y *B. quintana* (Kempf *et al.*, 2000; Harms & Dehio, 2012).

Después del quinto día de infección la bacteria se libera al torrente sanguíneo en donde se adhiere al eritrocito, provoca la deformación de su membrana, procede a la invasión y posterior replicación intracelular. Esta asociación explica el motivo por el cual ocurre la transmisión del patógeno por parte de vectores hematófagos de un hospedero a otro, ya que al existir una gran cantidad de bacterias presentes en los eritrocitos resulta mucho más sencillo infectar a un nuevo vector durante su ingesta de sangre (Harms & Dehio, 2012) (Fig. 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Bartonella*. a) Inoculación mediante la picadura o lesión en la piel por un vector. b) Colonización del nicho primario (fagocitosis por macrófagos, invasión de células endoteliales). c) Persistencia intracelular en el endotelio vascular. d) Liberación al torrente sanguíneo, donde invaden eritrocitos y reinfectan el nicho primario. e) Replicación intra-eritrocítica. (f) Ingesta de un artrópodo hematófago (Tomado de Harms & Dehio, 2012).



## **1.7 Métodos de diagnóstico para *Bartonella***

Las técnicas para la detección de *Bartonella* incluyen frotis de sangre, hemocultivo y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La tinción de Giemsa o Wright en un frotis sanguíneo para detectar bacilos intra-eritrocíticos, puede ser la única prueba para el diagnóstico en zonas endémicas (Angkasekwinaei *et al.*, 2014). El hemocultivo de estas bacterias toma de 5 a 15 días y hasta 45 días en un cultivo primario, no obstante, el aislamiento puede ser más difícil en muestras clínicas debido al uso de antibióticos y la presencia intracelular de las bacterias (La Scola & Raoult, 1999).

### **1.7.1 Inmunoensayos**

Las pruebas serológicas permiten comprobar la presencia de anticuerpos en la sangre. Su sensibilidad varía entre un 90 a 95 por ciento; sin embargo, estas pruebas son menos específicas y no logran distinguir la especie de *Bartonella* (Diddi *et al.*, 2013). El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se considera la prueba serológica más sensible para detectar infecciones pasadas (Sánchez-Clemente *et al.*, 2012). Otra opción consiste en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual es más accesible y tiene la capacidad de ser de alto rendimiento, aunque se ve limitado por su baja especificidad (Angkasekwinaei *et al.*, 2014).

### **1.7.2 Métodos moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* utilizada para la replicación masiva de una muestra de DNA, utilizada como molde para producir nuevas cadenas complementarias (McPherson & Moller, 2000). La PCR ofrece un método rápido, sensible y específico para detectar a un organismo directamente de muestras clínicas y se ha utilizado ampliamente para la detección y caracterización de las especies de *Bartonella* sin necesidad de cultivar a la bacteria (La Scola *et al.*, 2003; Diddi *et al.*, 2013).

## 1.8 Bartonelosis

La bartonelosis es un conjunto de enfermedades infecciosas producida por ciertas bacterias del género *Bartonella*, cuyo diagnóstico se ve obstaculizado por las manifestaciones clínicas variables (Diddi *et al.*, 2013). Las especies mejor estudiadas debido a la patogénesis que generan en el ser humano son las siguientes:

### 1.8.1 Fiebre de las trincheras (agente causal: *Bartonella quintana*)

Esta enfermedad provocó grandes epidemias en Europa durante la primera Guerra Mundial, ya que el agente causal se transmite de persona a persona por el piojo del cuerpo (*P. humanus humanus*). Los síntomas suelen variar en individuos sanos y en personas inmunocomprometidas, aunque siempre se ha caracterizado por fiebre periódica de 5 días acompañada de bacteremia intra-eritrocítica (Kaiser *et al.*, 2011).

Volvió a aparecer antes y después de la segunda guerra mundial en Europa, Asia y el Norte de África, y ha estado presente desde entonces en cada continente, a excepción de la Antártida y Australia. Reemergió nuevamente a finales del siglo XX, al reportarse en personas sin hogar de Estados Unidos y Europa (Jacomio *et al.*, 2002), cuyos estudios serológicos y moleculares oscilan entre el 10-15% de prevalencia (Ohl *et al.*, 2000).

Diversos estudios indican la presencia de *B. quintana* en restos antiguos, por ejemplo, se descubrió una fosa común del siglo XVIII en Douai, al norte de Francia, de donde se obtuvieron 55 dientes de 23 individuos, y mediante RT-PCR (PCR en tiempo real) del gen 16S-23S rRNA se detectó *B. quintana* en el diente de un individuo y a *Rickettsia prowasekii* en 17 dientes de 9 individuos (Fournier *et al.*, 2015). En otro estudio se utilizó PCR del gen *hbpE* (gen que codifica la proteína E de unión a hemina) para detectar *B. quintana* en 3 fragmentos de piojo corporal (*P. humanus corporis*) y en muestras provenientes de la pulpa dental de 10 dientes de 7 soldados del Ejército de Napoleón, encontrados en una fosa común en Vilna, Lituania (Raoult *et al.*, 2006; Fournier *et al.*, 2015).

Posteriormente, mediante “PCR suicida” (prueba en la que los oligonucleótidos se usan una vez, por lo que se utilizan varios marcadores moleculares) con el gen *hbpE* se observó la presencia de *B. quintana* en el diente de un individuo que había sido enterrado hace más de 4000 años (Drancourt *et al.*, 2005); mientras que otro registro proviene de esqueletos que datan del siglo XI al XV en tres sitios de entierros múltiples descubiertos en Bondy, Francia. Mediante la amplificación del gen *pla* y del gen del espaciador interno rRNA 16S-23S se detectó la presencia de *Yersinia pestis* en cuatro dientes de dos individuos, y *B. quintana* en tres dientes de tres individuos, incluyendo a uno infectado con ambos patógenos (Tran *et al.*, 2011; Fournier *et al.*, 2015).

### **1.8.2 Enfermedad de Carrión (agente causal: *Bartonella bacilliformis*)**

La enfermedad de Carrión inicia cuando *Lu. verrucarum* transmite *B. bacilliformis* a los seres humanos durante su alimentación. En algunos pacientes se presenta la fase aguda, denominada fiebre de Oroya, que ocurre cuando los organismos entran a los eritrocitos y se produce una hemólisis debido a la eritro-fagocitosis por histiocitos y macrófagos (Jacomó *et al.*, 2002). La bacteria tiene un tiempo promedio de incubación de 61 días (puede variar entre 10 a 210), lo que puede generar anemia severa e infecciones secundarias, provocando la muerte entre 44% al 88% de los pacientes sin tratamiento (Minnick *et al.*, 2014). La fase crónica es conocida como verruga peruana, que resulta en tumores vasculares que se originan a partir de la proliferación de células endoteliales colonizadas (Kaiser *et al.* 2011). Esto se observa principalmente en niños que habitan en áreas endémicas y se presenta después de la fase aguda o independientemente. Los tumores involucionan en un mes con tratamiento y tardan de 2 a 6 meses sin tratamiento (Maguiña & Gotuzzo 2000).

En el Continente Americano, los primeros registros de una enfermedad provocada por *B. bacilliformis* se observan en las vasijas de cerámica de siguientes culturas peruanas: Moche, ubicada en la costa norte de Perú (200-700 A.P [Antes del presente]) y Chancay de la costa central (1200-1450 A.P). Estas vasijas muestran individuos con lesiones similares a la enfermedad de la verruga peruana (Verano, 1997).

Por otro lado, en la costa sur de Perú se descubrió la presencia de la misma enfermedad en una momia precolombina (1400-1100 A.P) (Verano, 1997; Fournier *et al.*, 2015). Con la llegada de los españoles a América, el cronista Garcilazo de la Vega describió la primera epidemia de esta enfermedad en 1532 en Ecuador y lo describió como una enfermedad que produce verrugas en todo el cuerpo.

Mientras que en 1875 los trabajadores de la vía ferroviaria peruana entre Lima y Oroya comenzaron a enfermar: experimentaban fiebre, caían en un estado anémico y la mayor parte de los enfermos fallecía poco después (Maguiña & Gotuzzo, 2000). A este cuadro clínico se le denominó "fiebre de Oroya". Casi simultáneamente, se incrementó el número de casos de otra enfermedad conocida como "verruga peruana", que fue estudiada por el estudiante de medicina Daniel Alcides Carrión (1857-1885), quien trabajó en varios estudios clínicos y percibió que la verruga peruana no parecía ser contagiosa, por lo que su objetivo principal fue establecer la patogénesis de la enfermedad (Chatterjee *et al.*, 2014). En 1885, Alcides Carrión extrajo sangre procedente de la verruga eritematosa de una paciente previamente tratada para los síntomas de la "verruga peruana". La muestra de sangre fue utilizada para inocular su brazo, de tal manera que Alcides Carrión tomó notas del progreso de la enfermedad hasta que el 17 de septiembre desarrolló los síntomas típicos de la "fiebre de oroya": mialgia, artralgia, fiebre (no mayor de 39°C), hepatomegalia, esplenomegalia (Chatterjee *et al.*, 2014). Conforme progresaban los síntomas, Alcides Carrión notó que la enfermedad que había desarrollado era la fiebre de Oroya, advirtiendo la conexión existente entre ambas enfermedades con un solo agente infeccioso. Carrión falleció el 5 de octubre de 1885 por fiebre de Oroya (Cueto, 1996; Chatterjee *et al.* 2014).

### **1.8.3 Enfermedad del arañazo de gato (agente causal: *Bartonella henselae*)**

Los gatos domésticos son el hospedero natural de *B. henselae* y generalmente se consideran como hospederos aparentemente sanos de esta bacteria (Chomel *et al.*, 2009). Sin embargo, con base en resultados serológicos los gatos son más propensos a presentar linfadenitis, gingivitis, estomatitis y enfermedades urológicas (Glaus *et al.*, 1997).

Por otro lado, en los seres humanos se presenta “La enfermedad del arañazo de gato” (Cat scratch disease o CSD) provocada por *B. henselae* y menos frecuente por *B. clarridgeiae*, se transmite por mordeduras o arañazos de gatos (hay un caso con perros) infectados previamente por la pulga *C. felis* que actúa como vector (Kosoy *et al.*, 2012). El DNA de *B. henselae* también se ha detectado en las garrapatas *Ixodes pacificus* en América del Norte y en *Ixodes persulcatus* en el Este de Europa, respectivamente, y en *Ixodes ricinus* y *Dermacentor* sp en Europa central, aunque su papel como vectores de *Bartonella* no se ha comprobado (Kaiser *et al.*, 2011).

Ocasionalmente, los ganglios linfáticos infectados pueden formar una llaga de pus a través de la piel, siendo una causa común de la inflamación crónica de los ganglios linfáticos. Por lo general, la enfermedad es auto-limitada y los pacientes no requieren tratamiento con antibióticos (Kaiser *et al.*, 2011). La prevalencia de la enfermedad también varía con la ubicación geográfica: se informó que la prevalencia de anticuerpos contra *B. henselae* fue mayor en zonas con climas cálidos y húmedos, donde había una mayor prevalencia e intensidad de las infestaciones por pulgas de gato (Jacomo *et al.*, 2002).

En el 2004 se detectó *B. henselae* en la pulpa dental de tres gatos (del Siglo XIII, XVI y XV) encontrados en tres sitios de entierro diferentes de Francia (La VD *et al.*, 2004). Esta es la primera demostración de la presencia de *Bartonella* en su reservorio animal, mostrando la asociación de *B. henselae* con gatos hace 800 años (Fournier *et al.*, 2015).

#### **1.8.4 Potencial zoonótico de *Bartonella***

Se han encontrado especies asociadas a roedores en casos de bartonelosis humana, como un genotipo relacionado a *B. tribocorum* encontrado en pacientes humanos que presentaban un episodio febril de causas desconocidas en Tailandia (Kosoy *et al.*, 2010). *B. elizabethae* y *B. grahamii* se han encontrado en casos humanos causando neuroenititis (inflamación de la retina y del nervio óptico) y endocarditis (inflamación del revestimiento interno del endocardio) (Kaiser *et al.*, 2011).

Otras especies encontradas en casos de bartonelosis son *B. koehlerae*, *B. vinsonii subsp. berkhoffii* y *B. washoensis* en pacientes con endocarditis (inflamación del revestimiento interno del endocardio). *B. rochalimae*, *B. vinsonii subsp.*, *arupensis* y *B. tamie* fueron encontrados en casos de bacteremia (presencia de bacterias en la sangre) y fiebre (aumento de la temperatura del cuerpo por encima de la normal); mientras que *B. alsatica* provoca endocarditis (inflamación del revestimiento interno del endocardio) y linfadenitis (inflamación de los ganglios linfáticos) (Kaiser et al., 2011; Buffet *et al.*, 2013) (Tabla 2).

Diversas especies de *Bartonella* presentan un efecto de “salto” entre hospederos (Kosoy *et al.*, 2012), y si consideramos la gran diversidad de hospederos y vectores implicados en la transmisión de *Bartonella sp.*, la exposición humana a estos organismos incrementa el riesgo de contraer una posible bartonelosis (Breitschwerdt & Kordick, 2000).

El estudio del género *Bartonella* se ha enfocado en las especies que se encuentran asociadas a las bartonelosis más importantes en seres humanos, como *B. bacilliformis*, *B. quintana*, y *B. henselae*. Sin embargo, no son las únicas especies que pueden provocar enfermedades y existe el riesgo de no realizar un diagnóstico, ya que existen casos de endocarditis en humanos de diversas partes del mundo en donde no se diagnosticó el agente causal (Rocha *et al.*, 2014).

Además, los estudios muestran una creciente detección de nuevas especies de *Bartonella* en una amplia variedad de mamíferos y artrópodos que podrían servir como vectores (Buffet *et al.*, 2013). Sin embargo, además de los países en donde se presenta la enfermedad de Carrión como Perú, Ecuador y Colombia (Minnick *et al.*, 2014), no se ha explorado la posibilidad de encontrar *Bartonella* en el género *Lutzomyia*, cuya importancia como vector radica en la transmisión del parásito *Leishmania* en diversos países del Continente Americano, incluyendo a México (Ready, 2013).

## ANTECEDENTES

En México existen los siguientes reportes acerca del género *Bartonella* y de bartonelosis: Se han diagnosticado 150 casos de bartonelosis durante el periodo 2000-2013, principalmente en los estados de México y Chiapas (Sistema Único de Información y Vigilancia Epidemiológica-SUIVE); sin embargo, aun falta por determinar el agente causal en muchos de los casos. Así mismo, en la Ciudad de México se han registraron casos de enfermedades asociadas a *Bartonella*: se detectó mediante PCR la presencia de *B. quintana* en *Pediculus humanus humanus*, ectoparásito colectado de indigentes y prisioneros (Alcántara *et al.*, 2009), se reportó la presencia de *B. henselae* mediante ELISA en un paciente con la enfermedad del arañazo de gato (Vega *et al.*, 2010) y se reportó un caso de angiomatosis bacilar de un paciente con VIH, el cual fue diagnosticado mediante la observación de microorganismos identificados como *Bartonella* sp. en una biopsia de una lesión nodular, lo cual facilitó descartar otros cuadros clínicos pero no permitió determinar la especie de *Bartonella* (Romero *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha detectado la presencia del género *Bartonella* en diversos organismos que podrían ser hospederos o vectores, aunque se reportan diferentes resultados dependiendo del enfoque del artículo; por ejemplo, en un estudio de diversidad de comunidades se ha reportado una prevalencia de infección con *Bartonella* sp. del 25.6% (20/78) en roedores silvestres de Janos, Chihuahua, siendo *Onychomys torridus* la especie dominante del área (Bai *et al.*, 2009). En otro estudio realizado en Chihuahua se reporta una prevalencia de infección del 50.1% (245/489) en 12 especies de roedores. Encontraron 23 variantes genéticas de *Bartonella* y se agruparon en cinco grupos filogenéticos, tres de los cuales se relacionaron con agentes zoonóticos asociados a roedores: *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* y *Bartonella washoensis*. Los dos grupos restantes no están relacionados con las especies de *Bartonella* conocidas (Rubio *et al.*, 2014). En el noroeste de Chihuahua se encontró una prevalencia del 40.7% (307/760) en 10 especies de pulgas infectadas con *Bartonella* sp. Se encontraron 13 variantes genéticas y se agruparon en cinco grupos filogenéticos, dos de los cuales coincidieron con *B. vinsonii* subsp. *arupensis* y *B. washoensis*, especies transmitidas por pulgas y que se han asociado a diferentes roedores (Fernández-González *et al.*, 2016).

En San Luis Potosí se reportó una prevalencia del 30% (6/20) en piojos de la especie *Hoplopleura hirsuta* infectados con *Bartonella vinsonii* (los piojos fueron colectados de *Sigmodon hispidus*). Este estudio representa el primer reporte en México en detectar el DNA de *Bartonella* en piojos asociados con la rata *S. hispidus*, también conocida como rata algodonera (Sánchez-Montes *et al.*, 2016a).

En Yucatán se encontró una prevalencia del 58% (22/38) en roedores (*Peromyscus yucatanicus*). El análisis filogenético con el gen *gltA* mostró que casi todos los aislados estaban agrupados con *B. vinsonii subsp. vinsonii*, mientras que un aislado se encontraba entre *B. vinsonii subsp. berkhoffii* y *B. vinsonii subsp. arupensis*, y con base en un análisis de genes concatenados, los autores sugieren que este último puede ser una nueva subespecie, proponiendo el nombre *B. vinsonii subsp. yucatanensis* (Schulte *et al.*, 2016).

La distribución de *Lutzomyias* en México varía según la especie. En el estado de Nuevo León se tienen nuevos registros de *Lu. cruciata*, *Lu. shannoni*, *Lu. texana* y *Lutzomyia vindicator*, mientras que para el estado de Tamaulipas existen nuevos registros de *Lu. anthophora*, *Lutzomyia cratifer*, *Lu. cruciata*, *Lutzomyia ctenidophora*, *Lutzomyia oppidana*, *Lutzomyia permira*, *Lu. shannoni*, *Lu. texana* y *Lutzomyia trinidadensis*. Todas las especies son nuevos registros a excepción de *Lu. cruciata* y *Lu. texana* (Rodríguez-Rojas, 2012).

En el noreste de México también se han registrado casos de leishmaniasis cutánea difusa (LCD), provenientes de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Simpson *et al.*, 1968), lo cual indica la presencia de *Leishmania* en esos estados. Sin embargo, no existen reportes previos para *Bartonella* o bartonelosis en estas regiones del noreste de México.



## **2) JUSTIFICACIÓN**

En México, la detección de *Bartonella* en hospederos (roedores) y vectores (pulgas y piojos) se ha concentrado en cuatro estados: Ciudad de México, Chihuahua, Yucatán y San Luis Potosí, lo cual indica la falta de estudios del género en el resto del país. Además, no existen reportes previos con cualquier otro grupo de artrópodos como posibles vectores. Esto representa una oportunidad para iniciar el estudio de *Bartonella* en Nuevo León y Tamaulipas con especies del género *Lutzomyia* como posibles vectores.

## **3) HIPÓTESIS**

Algunas especies de *Lutzomyia* recolectadas en el noreste de México están infectadas por *Bartonella*, lo cual sugiere su papel como vector.

## **4) OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Identificar el DNA de *Bartonella* en *Lutzomyia* de Nuevo León y Tamaulipas.

### **4.2 Objetivos particulares**

1. Realizar un control positivo de extracción de DNA para 114 muestras de *Lutzomyia* (PCR rRNA *18S*).
2. Verificar la técnica de PCR para la detección de *Bartonella* en *Lutzomyia* mediante:
  - 2.1 La prueba de especificidad de los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n (para el gen *gltA*), utilizando DNA de *Rickettsia rickettsi*, *Borrelia burgdorferi* y *Leptospira interrogans serovar canicola*.
  - 2.2 La prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n (para el gen *gltA*) utilizando diferentes concentraciones de DNA de *Bartonella* detectada en un piojo de la especie *Hoplopleura hirsuta*.
3. Amplificación del DNA de *Bartonella* (gen *gltA*) en especies de *Lutzomyia*.
4. Determinar la prevalencia de *Bartonella* en las especies analizadas de *Lutzomyia* y realizar un análisis filogenético de las secuencias encontradas con respecto a las secuencias publicadas en la base de datos de GenBank.

## 5) MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio

La colecta de *Lutzomyia* fue realizada por el grupo del Dr. Eduardo Rebollar Téllez durante un periodo de cinco meses (abril a agosto) del 2010 en cinco municipios del estado de Nuevo León (Linares, Escobedo, Santiago, Mina y Cadereyta Jiménez), y en el municipio de Gómez Farías del estado de Tamaulipas (Rodríguez-Rojas, 2012).

Las muestras que se utilizaron en el presente estudio provienen de la colecta realizada durante junio a agosto en dos municipios del estado de Nuevo León (Santiago y Cadereyta Jiménez) y uno en Tamaulipas (Gómez Farías).

En el estado de Nuevo León, las colectas se realizaron en:

1) Municipio de Cadereyta Jiménez: la colecta se realizó del 27 al 29 de agosto en el Fraccionamiento Rincón de los Sabinos 2° Sector (25°25'35" N; 99°58'23" W); el clima se clasifica como [(A) C<sub>1</sub>], semi-cálido húmedo, la temperatura media anual es de 21°C con una precipitación anual de 1558 mm y 1778 (García, 2004). Las especies de árboles en el área son: *Prosopis glandulosa*, *Acacia farnesiana*, *Ehretia anacua*, y *Pithecellobium ebano* (Rzedowski, 1978).

2) Municipio de Santiago: la colecta se realizó del 20 al 22 de junio en la localidad de Ciénega de González (25°22'39" N; 100°14'31" W), el clima se considera semi-cálido húmedo ((A) C<sub>1a</sub>), la temperatura media anual es de 20.9°C, con una precipitación anual de 1.015 mm (García, 2004). Este sitio se encuentra en el bosque Ciénega de González de la Sierra Madre Oriental, con pinos y robles como especies dominantes de árboles; *Quercus rysophylla* Weath, *Quercus laeta* Liebm, *Quercus polymorpha* Schlecht, *Pinus teocote* Schlecht y *Pinus pseudostrobus* Lindl (Rzedowski 1978).

En el estado de Tamaulipas, la colecta se realizó del 28 al 30 de julio en el municipio de Gómez Farías (23°04'17" N; 99°10'16" W) el clima es seco semi-cálido (BS1hw), con una temperatura media anual de 23°C y una precipitación anual de 601 a 800 mm (García, 2004). El sitio de estudio se compone de asentamientos sub-urbanos rodeados de agricultura y parches de vegetación secundaria: *Mangifera indica*, *Ceiba pentandra*, *Brosimum alicastrum*, y *Mirandaceltis monoica* (Rzedowski, 1978).m

### **5.1.1 Colecta y procesamiento de diversas especies del género *Lutzomyia***

Los ejemplares fueron capturados mediante trampas de luz CDC, modelo 512 [John W. Hock Co., Gainesville, FL, EE.UU.] (Saudi & Chamberlain, 1962). Cada trampa de luz fue colgada entre 1.3-1.5 m por encima del suelo y fueron operadas desde las 18:00 pm a las 07:00 am. En cada sitio de colecta se utilizaron 16 trampas de luz CDC, las cuales fueron distribuidas a lo largo de un solo transecto lineal y se colocaron a 25 m de distancia.

Todas las mañanas se colocaron los flebotominos en un recipiente hermético junto con una pequeña bola de algodón impregnada con éter para matar a los ejemplares. Posteriormente, las muestras se colocaron en bandejas blancas y fueron separadas de otros insectos. Mediante el uso de pinzas de punta fina, se procedió a depositar algunas muestras de flebotominos en viales de plástico con etanol al 70% para conservarlas, mientras que las hembras capturadas se conservaron individualmente en viales Eppendorf que contenían 200 µl de etanol absoluto. A la llegada a las instalaciones de laboratorio, todas las muestras se mantuvieron en un refrigerador a 4°C hasta su procesamiento, el cual se llevó a cabo siguiendo técnicas curatoriales [Apéndice 10.1.1] (Young & Perkins, 1984).

La identificación de especies [Apéndice 10.1.1] fue realizada por el grupo del Dr. Eduardo Rebollar Téllez utilizando las claves de Young y Duncan (1994), Ibáñez-Bernal (2005a, 2005b) (Rodríguez-Rojas, 2012). Los especímenes de referencia fueron conservados en el Laboratorio de Entomología Médica (UANL). Se realizó la extracción del DNA de los flebotominos mediante la técnica de fenol cloroformo alcohol isoamílico [Apéndice 10.1.2].

## 5.2 Control positivo de extracción del DNA de *Lutzomyia*

Las *Lutzomyias* del presente estudio provienen de una colecta realizada en el 2010 a cargo del grupo del Dr. Eduardo Rebollar Téllez en dos municipios de Nuevo León (15 muestras) y un municipio de Tamaulipas (104 muestras) [Apéndice 10.2 y 10.3]. Para establecer un control de extracción del DNA de *Lutzomyia sp.*, se utilizaron los oligonucleótidos basados en las secuencias del gen 18S rRNA [5'-TGCCAGTAGTTATATGCTTG-3\_ (Lu. 18S rRNA-1S) y 5'-TTACGCGCCTGCTGCCTTCC-3\_ (Lu. 18S rRNA-1R)] (Kato *et al.*, 2005) en una muestra de DNA que se había extraído en años atrás. La PCR se llevó a cabo utilizando la mezcla de reacción: 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 9.5 µL de agua libre de nucleasas, 10 ng de DNA de *Lutzomyia* y 100 ng de cada oligonucleótido: Lu. 18S rRNA-1S y Lu. 18S rRNA-1R. El ciclo de PCR consistió de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por tres minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C y 10 minutos a 72°C para finalizar (Kato *et al.*, 2005). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X [Apéndice 10.1.3].

## 5.3 Verificación de la técnica de PCR para la detección de *Bartonella sp*

Se realizó la verificación de la PCR para la detección de *Bartonella* con un análisis de la especificidad y sensibilidad de los los oligonucleótidos (5.3.1 y 5.3.2 respectivamente), utilizando los siguientes reactivos: 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 9.5 µL de agua libre de nucleasas y 100 ng de cada oligonucleótido, basados en la secuencia de la citrato sintasa (*gltA*): BhCS.781p y BhCS.1137n. El ciclo de PCR utilizado en este estudio consistió de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por tres minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos 95°C, 30 segundos a 51°C, 30 segundos a 72°C y 72°C durante 7 minutos para finalizar (Rubio *et al.*, 2014). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X [Apéndice 10.1.3].

### 5.3.1 Prueba de especificidad

La prueba de especificidad se realizó con la finalidad de asegurar la amplificación del DNA de *Bartonella*, por lo que se efectuó la PCR utilizando muestras de DNA de diferentes bacterias, tales como: *Leptospira interrogans* serovar canicola, *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia rickettsii* y *Bartonella vinsonii*. El DNA de *Bartonella* que se utilizó provenía de un piojo de la especie *Hoplopleura hirsuta*, colectado de la rata alodonera (*Sigmodon hispidus*) en San Luis Potosí (Sánchez-Montes *et al.*, 2016a).

### 5.3.2 Prueba de sensibilidad

Para determinar el límite de detección de los oligonucleótidos se llevó a cabo la prueba de sensibilidad que consistió en realizar una PCR a partir de diluciones seriadas con el DNA de *Bartonella* detectada en *H. hirsuta* (Sánchez-Montes *et al.*, 2016a), las cuales se realizaron tomando 1 µL del DNA y agregando 9 µL de agua desionizada, obteniendo las siguientes diluciones: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>, 1:10<sup>7</sup>, 1:10<sup>8</sup>.

### 5.3.3 Amplificación del DNA de *Bartonella* en *Lutzomyia*

Para realizar la detección del DNA de *Bartonella* en *Lutzomyia* se utilizaron los siguientes reactivos para la mezcla de reacción: 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI), 9.5 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de DNA de las muestras de *Lutzomyia* positivas al control de extracción (81 en total) y 100 ng de cada oligonucleótido, basados en la secuencia de la citrato sintasa (*gltA*): BhCS.781p y BhCS.1137n. Cada PCR realizada tenía un control positivo (DNA de *Bartonella*) y un control negativo (agua). El ciclo de PCR utilizado en este estudio consistió de una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por tres minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 51°C, 30 segundos a 72°C y 72°C durante 7 minutos para finalizar (Rubio *et al.*, 2014). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X [Apéndice 10.1.3].

#### 5.4 Prevalencia de infección y análisis de secuencias.

Con las muestras de PCR positivas a *Bartonella* se obtuvo la prevalencia de infección tomando en cuenta el total de ejemplares positivos al control de extracción con el gen 18S rRNA (los ejemplares que contenían DNA de *Lutzomyia*) y se dividió entre el número de positivos a *Bartonella*, lo cual se multiplicó por 100 (Tabla 3). Posteriormente se rotularon los productos de PCR positivos a *Bartonella* para enviarlos al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM para que se realizara una secuenciación de Sanger en dirección 5'-3'.

Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a realizar un alineamiento de nucleótidos utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con secuencias existentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se visualizó el cromatograma en la aplicación Chromas Lite y se realizó la edición de secuencias para efectuar el alineamiento en el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) con CLUSTAL W, utilizando las secuencias disponibles en GenBank de las especies del género *Bartonella* [Apéndice 10.2] y secuencias de *Bartonella* sp., en México [Apéndice 10.3]. Con base en este alineamiento se realizó la identificación de haplotipos (variación en la secuencia) mediante el programa DNAsp.

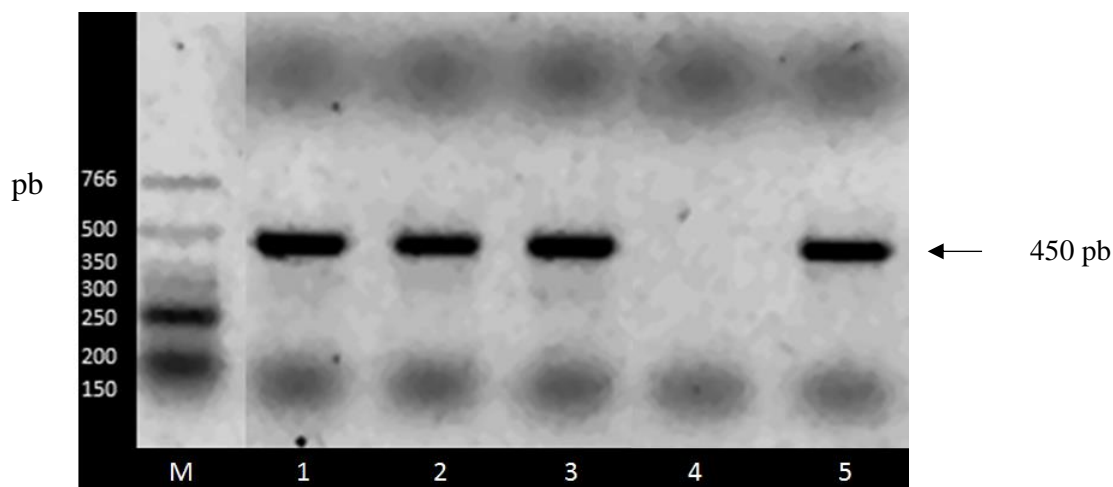
Con los alineamientos se llevó a cabo un análisis fenético utilizando el método de Neighbor Joining; además se realizó un análisis filogenético utilizando Maximum likelihood (máxima verosimilitud). Ambos análisis fueron realizados con el modelo de evolución de Tamura 3 parámetros, el cual fue sugerido por el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Se realizaron 1,000 replicas de Bootstrap para estimar la confiabilidad de los nodos en los árboles obtenidos, descartando los valores inferiores a 50 bootstrap (Sánchez-Montes *et al.* 2016b). También se generó una matriz de distancias con el modelo de Tamura de 3 parámetros el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), la cual incluyó las secuencias del gen *gltA* de las especies tipificadas de *Bartonella*, secuencias de *Bartonella* sp., reportadas en México y secuencias obtenidas en el presente estudio.

## 6) RESULTADOS

### 6.1 Control positivo de extracción del DNA de *Lutzomyia*

En este estudio se implementó un control positivo de extracción del DNA de *Lutzomyia* mediante la amplificación por PCR para el gen 18S rRNA con los oligonucleótidos Lu. 18S rRNA-1S y Lu. 18S rRNA-1R (Kato *et al.*, 2005) debido a que habían transcurrido seis años desde la colecta y extracción del DNA de *Lutzomyia* spp.

En la figura 3 (representativa de los productos de PCR analizados en geles de agarosa) se observa la amplificación de una banda de 450 pb en los carriles 1-3, que corresponden a las muestras de DNA de diferentes especies de *Lutzomyia*: *Lutzomyia diabolica*, *Lutzomyia texana* y *Lutzomyia cruciata*. También se observa un exceso de oligonucleótidos en la parte inferior y superior de cada carril, lo cual es normal en cada PCR. Por lo tanto, de un total de 114 muestras (99 de Tamaulipas y 15 de Nuevo León), se obtuvieron 81 positivos (68 de Tamaulipas y 13 de Nuevo León), los cuales fueron utilizados para detectar *Bartonella*.



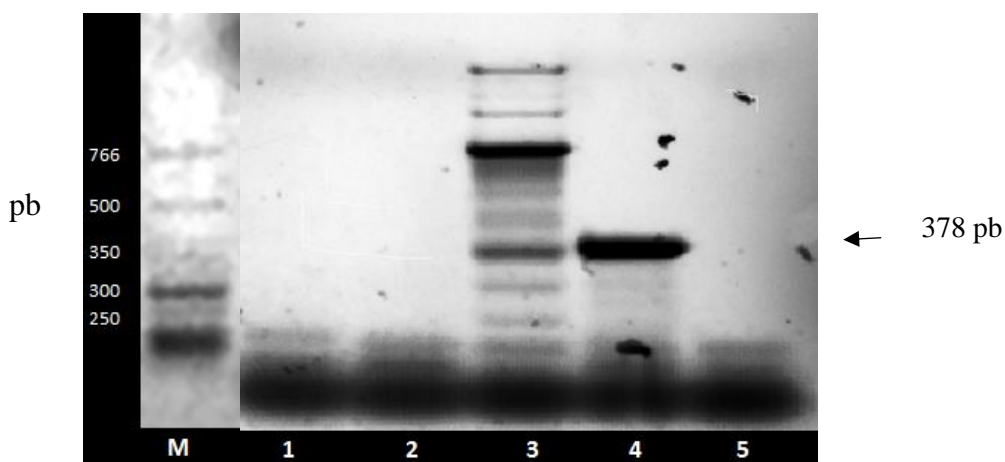
**Figura 3.** Control positivo de extracción del DNA de *Lutzomyia* sp. **Carril M:** marcador de peso molecular LMW DNA Ladder; **carril 1:** DNA de *Lu. diabolica*; **carril 2:** DNA de *Lu. texana*; **carril 3:** DNA de *Lu. cruciata*; **carril 4:** control negativo (agua); **carril 5:** control positivo (DNA de *Lu. cruciata*).

## 6.2 Verificación de la técnica de PCR para la detección de *Bartonella sp*

### 6.2.1 Prueba de especificidad

En la PCR realizada para determinar la especificidad de los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n para *Bartonella* (Norman *et al.*, 1995) no se observó ninguna banda de amplificación para el DNA de la cepa de *Leptospira interrogans* Shena 1342K (carril 1) y de *Borrelia burgdorferi* (carril 2).

Se observaron múltiples bandas inespecíficas en el carril 4 que corresponde a DNA de *Rickettsia rickettsi*, lo cual podría deberse a la similitud del 78 al 83% entre los oligonucleótidos de *Bartonella sp.*, y *Rickettsia sp.*, además, los oligonucleótidos de *Bartonella sp.*, se diseñaron con base en secuencias de *Rickettsia prowazekii* (Norman *et al.*, 1995). No obstante, los oligonucleótidos amplificaron una sola banda para *Bartonella* en el peso molecular esperado de 378 pb en el carril 4, por lo que son adecuados para la determinación de *Bartonella sp.* en especies de *Lutzomyia* (Fig. 4).



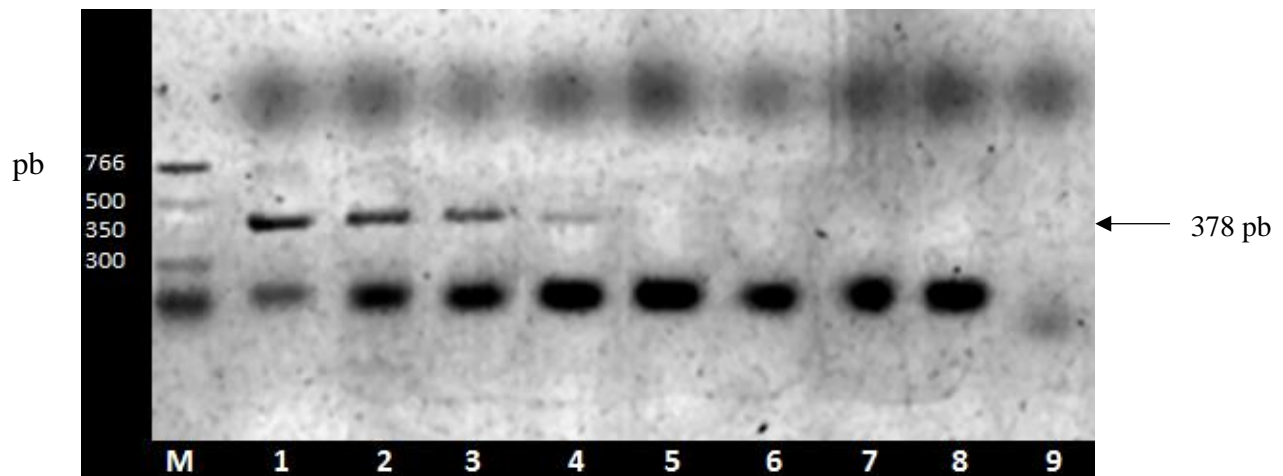
**Figura 4.** Prueba de especificidad de los oligonucleótidos utilizados para la detección de *Bartonella sp*. **Carril M:** marcador de tamaño molecular LMW DNA Ladder; **carril 1:** DNA de *Leptospira* Shena 1342K; **carril 2:** DNA de *Borrelia burgdorferi*; **carril 3:** DNA de *Rickettsia rickettsi*; **carril 4:** control positivo (DNA de *Bartonella* en *H. hirsuta*); **carril 5:** control negativo (agua).



### 6.2.2 Prueba de sensibilidad

Debido a que no fue posible estimar la cantidad de DNA de *Bartonella* que los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n pueden detectar, ya que la muestra utilizada como control positivo provenía de un piojo infectado con *Bartonella* (Sánchez-Montes *et al.*, 2016a), se realizó una PCR con diluciones seriadas.

En la figura 5 se observa una banda de 378 pb en las diluciones: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 (carriles 1-4); y no se detectó ninguna amplificación en las diluciones: 1:100000, 1:1000000, 1:10000000, 1:100000000 (carriles 5-8). De tal forma que los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n son lo suficientemente sensibles para detectar *Bartonella*, amplificando hasta una dilución de 1:10000.

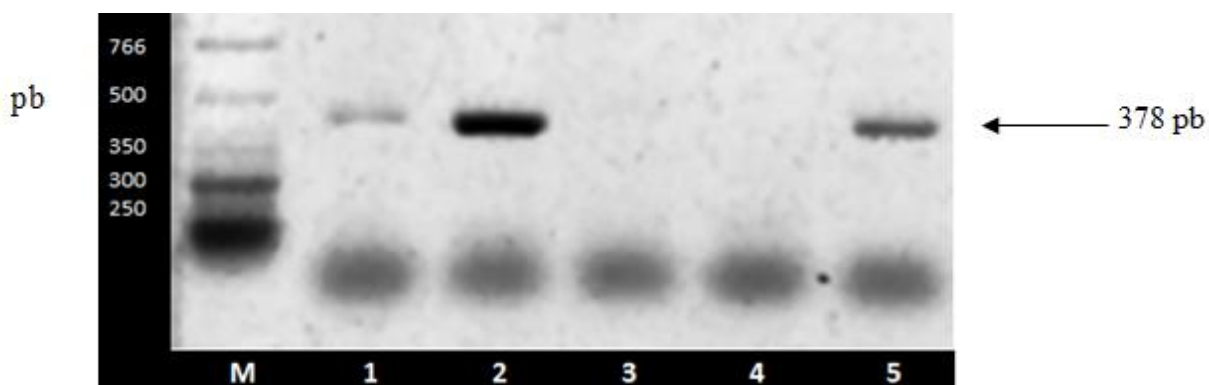


**Figura 5.** Prueba de sensibilidad de los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n. **Carril M:** marcador de tamaño molecular LMW DNA Ladder; **carril 1:** control positivo (DNA de *Bartonella* en *H. hirsuta*), dilución 1:10; **carril 2:** dilución 1:100; **carril 3:** dilución 1:1000; **carril 4:** dilución 1:10000; **carril 5:** dilución 1:100000; **carril 6:** dilución 1:1000000; **carril 7:** 1:10000000; **carril 8:** dilución 1:100000000; **carril 9:** control negativo, agua.

### 6.2.3 Amplificación de *Bartonella* en especies de *Lutzomyia*

Para determinar la presencia de *Bartonella* sp. en muestras del género *Lutzomyia* de los estados de Nuevo León (n=13) y Tamaulipas (n=68), se analizaron un total de 81 ejemplares (Tabla 3), utilizando los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n, específicos para el género *Bartonella* (Rubio *et al.*, 2014). Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa, observándose una banda de 378 pb en los carriles 1 y 2, que corresponde al tamaño molecular esperado de *Bartonella* (Fig. 6).

Para Nuevo León no se obtuvieron positivos a *Bartonella*, sin embargo, para Tamaulipas se obtuvieron 11 positivos a *Bartonella* de 68 muestras de *Lutzomyia* analizadas.



**Figura 6.** Detección de *Bartonella* en *Lutzomyia*. **Carril M:** marcador de peso molecular LMW; **carril 1:** DNA de *Lu. shannoni* positiva a *Bartonella*; **carril 2:** DNA de *Lu. cruciata* positiva a *Bartonella*; **carril 3:** DNA de *Lutzomyia cratifer* negativa a *Bartonella*; **carril 4:** control negativo (agua); **carril 5:** control positivo (DNA de *Bartonella* en *H. hirsuta*).

### 6.3 Análisis de secuencias

#### 6.3.1 Prevalencia de positivos a *Bartonella*

En el municipio de Santiago (estado de Nuevo León) se analizaron tres ejemplares (dos *Lu. diabolica* y una *Lu. cruciata*) y en el municipio de Cadereyta Jiménez del mismo estado se analizaron un total de 10 ejemplares (cinco *Lu. texana*; dos *Lutzomyia sp.*; dos *Lutzomyia vindicator*; una *Lutzomyia anthophora*). De los 13 ejemplares de *Lutzomyia* analizados del estado de Nuevo León, no se obtuvo ningún resultado positivo a *Bartonella*. En el municipio de Gómez Farías (estado de Tamaulipas), se analizaron 68 ejemplares (una *Lutzomyia cratifer*, 38 *Lu. cruciata*, dos *Lutzomyia sp.* y 27 *Lu. shannoni*) de los cuales 11 resultaron positivos (ocho *Lu. shannoni* y tres *Lu. cruciata*) para *Bartonella sp.* (Tabla 3).

**Tabla 3. Especies de *Lutzomyia* analizadas para *Bartonella* en las localidades de Nuevo León y Tamaulipas.**

Especies	Tamaulipas			Nuevo León			
	Gómez Farías			Santiago		Cadereyta	
	18S (Lutz)	B	%	18S (Lutz)	B	18S (Lutz)	B
<i>Lutzomyia anthophora</i>	-	-	-	-	-	1	0
<i>Lutzomyia cratifer</i>	1	0	0	-	-	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i>	<b>38</b>	<b>3</b>	<b>7.9</b>	1	0	-	-
<i>Lutzomyia sp.</i>	2	0	0%	-	-	2	0
<i>Lutzomyia diabolica</i>	-	-	-	2	0	-	-
<i>Lutzomyia shannoni</i>	<b>27</b>	<b>8</b>	<b>29.6</b>	-	-	-	-
<i>Lutzomyia texana</i>	0	0	0	-	-	5	0
<i>Lutzomyia vindicator</i>	-	-	-	-	-	2	0
<i>Lutzomyia deleoni</i>	0	0	0	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>11</b>	<b>16.2</b>	3	-	10	-

(18S: control positivo de extracción de DNA de las 81 muestras analizadas de *Lutzomyia*; B: positivos a *Bartonella*; %: prevalencia).

Las 11 muestras positivas a *Bartonella*, se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología, UNAM, Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias del GenBank utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), lo cual permitió visualizar el “Score Blast” (un potente indicador de la calidad del alineamiento).

De acuerdo a los alineamientos locales realizados con BLAST, seis secuencias del presente estudio cumplen con el score (puntaje) adecuado (80-200) para asegurar una similitud con el resto de las secuencias de *Bartonella*. Las seis secuencias se dividieron en 3 haplotipos. El haplotipo 1 corresponde a una secuencia de *Lu. shannoni*, el haplotipo 2 corresponde a una secuencia de *Lu. cruciata* y el haplotipo 3 está integrado por cuatro secuencias de *Lu. shannoni* (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados positivos para la amplificación de DNA de *Bartonella sp.*

<i>Lutzomyia</i>	Clave muestra	Clave de secuenciación	Score Blast	% similitud	Haplotipo
<i>Lutzomyia cruciata</i>	8 <sup>a</sup>	8b	80-200	93	2
<i>Lutzomyia shannoni</i>	8b	1b	sin resultado	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i>	8c	7b	>40	-	-
<i>Lutzomyia shannoni</i>	8d	14b	80-200	93	3
<i>Lutzomyia shannoni</i>	15f	9b	80-200	93	3
<i>Lutzomyia shannoni</i>	17 <sup>a</sup>	13b	>40	-	-
<i>Lutzomyia shannoni</i>	12uno	15b	sin resultado	-	-
<i>Lutzomyia shannoni</i>	12dos	17b	80-200	93	3
<i>Lutzomyia shannoni</i>	4-uno	5b	80-200	95	1
<i>Lutzomyia shannoni</i>	6b	16b	80-200	93	3
<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-a	19b	>40	-	-

### 6.3.2 Alineamiento de secuencias

De acuerdo al análisis obtenido del algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), las seis secuencias obtenidas en este estudio muestran porcentajes de similitud del 93 al 95%.

Se realizó un alineamiento global con el programa MEGA 6.0 de los 3 haplotipos y las secuencias de referencia obtenidas de GenBank: 17 secuencias de especies de *Bartonella* (La Scola, 2003) (Apéndice 10.2), 21 secuencias de *Bartonella sp.* reportadas en México (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016a; Kosoy & Morway, 2008; Morse *et al.*, 2012) y una secuencia de *Brucella melitensis* para enraizar el árbol. Debido a la longitud de las secuencias de este estudio, se recortaron los sitios que sobresalían para obtener un alineamiento de secuencias de 200 pb.

La estimación de la matriz de sustitución de Tamura 3 parámetros (Tabla 5) obtuvo el valor BIC de 3902.9.

**Tabla 5. Matriz de sustitución de Tamura 3 parámetros.** Muestra las tasas de sustitución de transiciones y transversiones (en negritas).

	A	T	C	G
A	-	<b>0.03014</b>	<b>0.0157</b>	0.1399
T	<b>0.03014</b>	-	0.1399	<b>0.0157</b>
C	<b>0.03014</b>	0.2683	-	<b>0.0157</b>
G	0.2683	<b>0.03014</b>	<b>0.0157</b>	-

### 6.3.3 Análisis de distancias

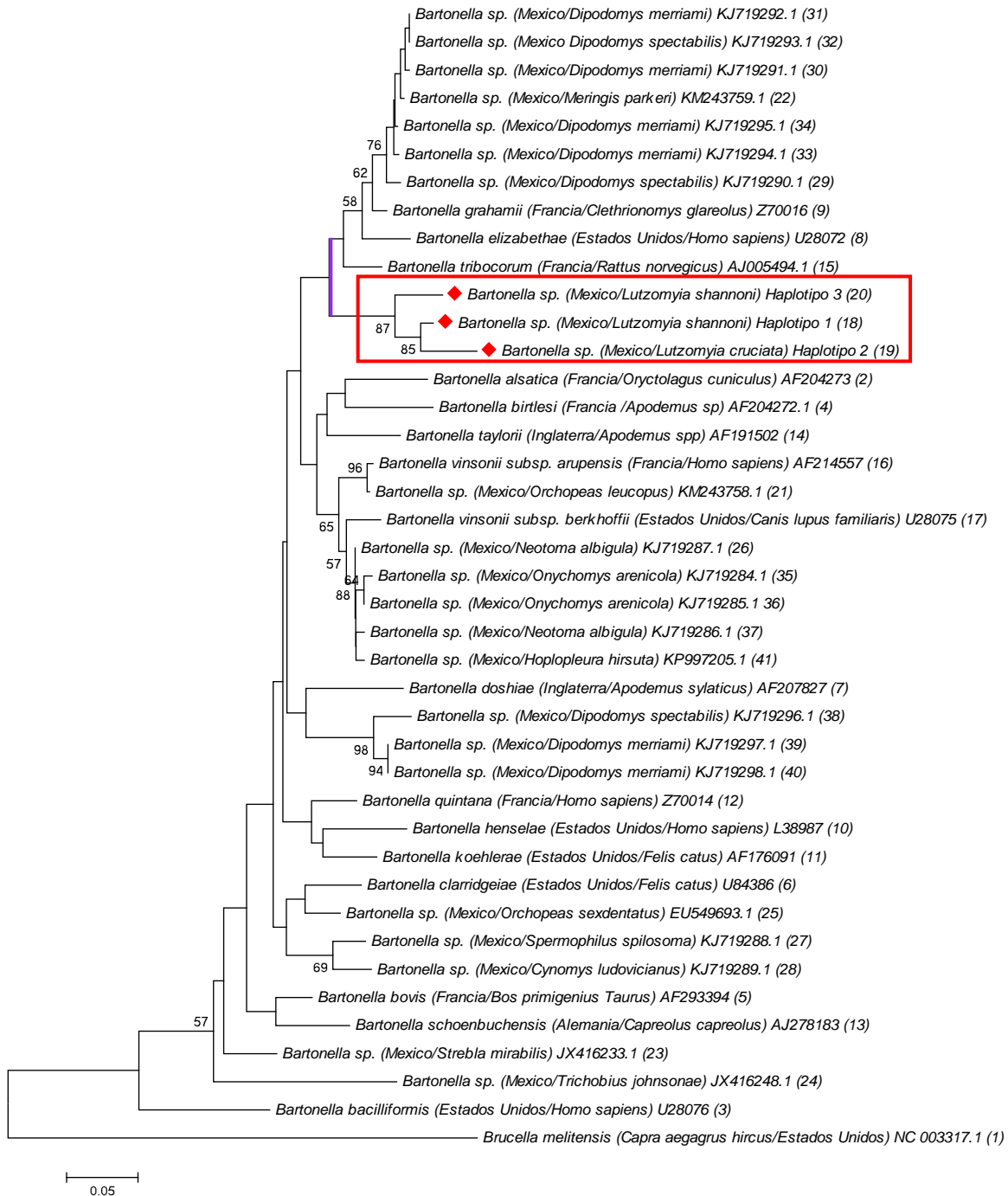
Las secuencias analizadas para *Bartonella* —tanto las del presente estudio como las de referencia, excluyendo la secuencia del grupo externo, *Brucella melitensis*—, muestran un intervalo de distancia desde 0.000-0.356.

Las distancias intraespecíficas más pequeñas se registraron entre las secuencias de *Bartonella sp.* encontradas en México (KJ719297.1 y KJ719298.1; KJ719293.1 y KJ719292.1) con un valor de 0.000. Las secuencias KJ7192 de *Bartonella sp.* encontradas en México están estrechamente vinculadas entre sí, mostrando un intervalo que va desde 0.000-0.199.

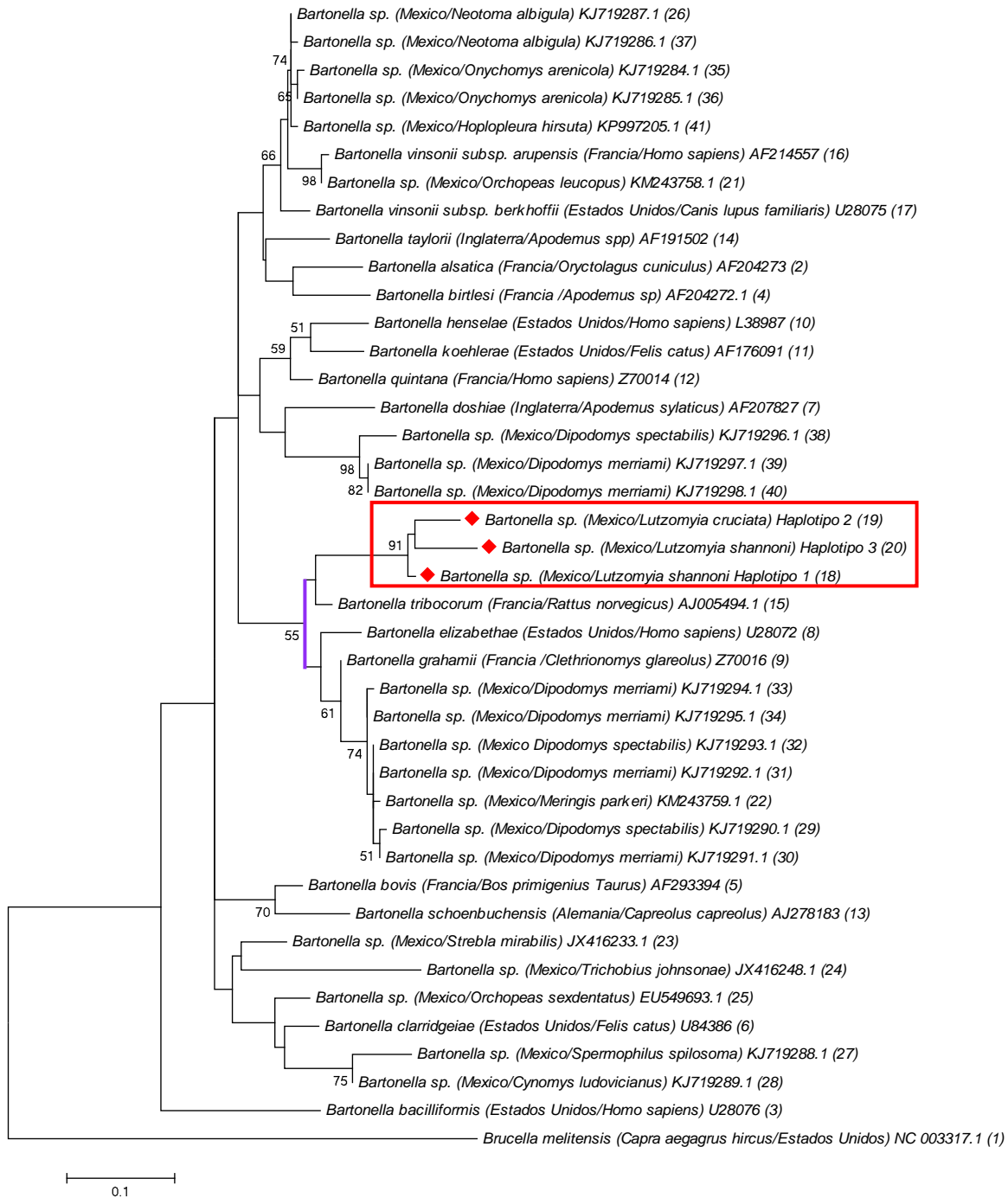
Se observó que todas las secuencias de *Bartonella* mantenían una mayor distancia con respecto a la secuencia de *B. melitensis* (0.494-0.648) y, excluyendo esta secuencia, todas las secuencias de *Bartonella* exhiben valores muy pequeños (0.000-0.356).

Las distancias más pequeñas entre los haplotipos encontrados en los ejemplares de *Lutzomyia* de México se encontraron en *Lu. shannoni* (haplotipo 1) y *Lu. cruciata* (haplotipo 2): 0.048. La distancia entre los haplotipos 1 y 3 de *Lu. shannoni* fue 0.062. La distancia entre el haplotipo 3 de *Lu. shannoni* y el haplotipo 2 de *Lu. cruciata* fue 0.090.

La secuencia que tenía una distancia mayor a las secuencias de *Bartonella* encontradas en *Lutzomyia* (excluyendo a la secuencia del grupo externo, *B. melitensis*) fue *B. bacilliformis* (0.287).



**Figura 7.** Árbol de Neighbor—Joining basado en las secuencias del gen *gltA* de las especies tipificadas de *Bartonella*, secuencias de *Bartonella* sp. reportadas en México y las secuencias del presente estudio (◆). Los valores de bootstrap fueron calculados con el modelo de distancias de Tamura tres parámetros (Tamura, 1992).



**Figura 8.** Árbol de Maximum Likelihood basado en las secuencias del gen *gltA* de las especies tipificadas de *Bartonella*, secuencias de *Bartonella* sp., reportadas en México y las secuencias del presente estudio (♦). Los valores de bootstrap fueron calculados con el modelo de distancias de Tamura tres parámetros (Tamura, 1992).



## 7) DISCUSIÓN

En este estudio se implementó un control positivo de extracción, el cual reafirma que los oligonucleótidos Lu. 18S rRNA-1S y Lu. 18S rRNA-1R son adecuados para detectar el DNA de *Lutzomyia* (Kato *et al.*, 2005). Posteriormente, y con el fin de verificar la técnica de PCR para la detección de *Bartonella* en *Lutzomyia*, se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n, lo cual permitió confirmar que los oligonucleótidos permiten detectar *Bartonella*, ya que amplificaron una sola banda en el peso molecular esperado; no obstante, también permitirían la detección de *Rickettsia* debido a la similitud del 83% que existe en los oligonucleótidos para ambos géneros (Norman *et al.*, 1995). Después se realizó la prueba de sensibilidad, la cual indica que los oligonucleótidos BhCS.781p y BhCS.1137n permiten detectar hasta una dilución de 1:10000 del DNA de *Bartonella*, de tal forma que se procedió a realizar la detección del DNA de *Bartonella* en especies del género *Lutzomyia* con el ciclo de PCR previamente reportado por Rubio *et al.*, 2014, y al no presentarse ningún error durante la amplificación se puede concluir que los oligonucleótidos permiten la detección sin ningún problema en *Lutzomyia*, lo cual no se había reportado previamente.

Las seis secuencias de *Bartonella* se dividieron en 3 haplotipos (variación en la secuencia constituida principalmente por porlimorfismos de un solo nucleótido): el haplotipo 1 contenía una secuencia encontrada en *Lu. shannoni*, el haplotipo 2 contenía una secuencia encontrada en *Lu. cruciata*, sin embargo, el haplotipo 3 fue el dominante ya que contenía cuatro secuencias y fue encontrado en *Lu. shannoni*. El análisis filogenético de Maximum Likelihood agrupa a los tres haplotipos con un valor de bootstrap de 91, lo cual quiere decir que tanto las secuencias de *Lu. cruciata* como la de *Lu. shannoni* corresponden al mismo linaje (población de secuencias que forman una línea directa de descendencia) del género *Bartonella*. El análisis también agrupa al haplotipo 2 y 3 de *Lu. cruciata* y *Lu. shannoni* con un valor de 38 bootstrap, lo cual sugiere que la secuencias de *L. cruciata* podrían formar un clado adicional, si se dispusiera de un número mayor de secuencias. Sin embargo, el análisis de Neighbor—Joining revela un valor de bootstrap de 87 entre esos haplotipos, lo que indica que las secuencias del presente estudio están relacionadas entre sí.

Para Maximum Likelihood, las secuencias del presente estudio encontradas en *Lutzomyia* están agrupadas con un valor de bootstrap de 55 junto a especies de *Bartonella* asociadas a roedores: *B. tribocorum*, *B. grahamii* y *B. elizabethae*, además de 6 secuencias de *Bartonella* sp., encontradas en *Dipodomys merriami* (GenBank KJ719290-KJ719295) provenientes de Janos, Chihuahua, México (Rubio *et al.*, 2015) y otra secuencia encontrada en la misma región (Fernández-González, *et al.*, 2014) de la pulga *Meringis parkeri* (GenBank KM243759). La mayor parte de los valores de bootstrap están por debajo de 70, lo cual indica un bajo apoyo estadístico. Sin embargo, los valores bajos de bootstrap se han registrado previamente en análisis de parsimonia o distancias (Birtles & Raoult, 1996; Houpiikian *et al.*, 2001) y se han relacionado al tamaño de las secuencias (alrededor de 327 pb). No obstante, también se podría explicar este hecho tomando en cuenta la diversidad genética del género *Bartonella*. Por ejemplo, debido al hallazgo de una amplia diversidad genética en aislados detectados con el gen de *gltA*, se ha comprobado la presencia de eventos de recombinación en el mismo (Paziewska *et al.*, 2011).

La prevalencia de infección por *Bartonella* en ejemplares del género *Lutzomyia* provenientes del estado de Tamaulipas fue de 16.2% (11/68): en *Lu. cruciata* se detectó una prevalencia del 7.9% (3/38) y en *Lu. shannoni* una prevalencia del 29.6% (8/27). Estos resultados contrastan con lo reportado previamente en el género *Lutzomyia* relacionado con *B. bacilliformis*: en *Lu. verrucarum* la prevalencia varía de 0.4 - 3% (Hertig, 1948) y en *Lu. peruensis* de 1% (2/104) (Ellis *et al.*, 1999). Estos reportes son los únicos que han registrado la presencia de *Bartonella* en *Lutzomyia*, que refleja que se han realizado muy pocos estudios respecto al género *Lutzomyia* en la transmisión de *Bartonella* (Sánchez-Clemente *et al.*, 2012) y no presentan evidencia suficiente que sustente su posible papel como vectores. Por ejemplo, el artículo de Caceres *et al.* (1997) indica la presencia de *Lu. robusta* y *Lu. maranonensis* en el interior de las casas de los habitantes de zonas endémicas para la enfermedad de Carrión, en Perú. Sin embargo, no se realizó la detección de *Bartonella* en los ejemplares colectados, por lo que aún falta determinar si estas especies de *Lutzomyia* podrían ser vectores de *Bartonella*.

En otros vectores se han reportado prevalencias más elevadas a las encontradas en *Lutzomyia*, como las pulgas de gato (*C. felis*) con una prevalencia total de 26.2% (81/309) para las siguientes especies: *B. henselae* (9/81; 11.1%), *B. clarridgeiae* (55/81; 67.9%), *B. quintana* (14/81; 17.3%), y *B. koehlerae* (3/81; 3.7%) (Rolain *et al.*, 2003). En el caso de los piojos, la prevalencia suele variar debido a la cantidad de piojos en cada persona; por ejemplo, en el artículo de Bonilla *et al.*, (2009) se reporta una prevalencia total de 33.3% (11/33) en *P. humanus corporis*, y mientras una persona puede presentar una prevalencia del 87% (13/15), otra puede tener una prevalencia del 64% (27/42). No obstante, aún no se ha investigado si diferencia en la prevalencia está relacionada al tipo de vector (pulgas, piojos, flebotominos).

Actualmente, los análisis filogenéticos para *Bartonella* utilizan más de un marcador molecular (Buffet *et al.*, 2013). No obstante, para la detección y caracterización de *Bartonella* es posible utilizar únicamente el gen de la *gltA* que codifica la coenzima citrato sintasa, la cual ejerce un papel fundamental durante el metabolismo celular, por lo cual se trata de un gen con poca variabilidad que permite diferenciar especies estrechamente relacionadas. Por otra parte, es posible proponer una nueva especie de *Bartonella* si la similitud entre las secuencias encontradas y las secuencias tipificadas es inferior al <96% y <95.4% para un fragmento del gen *gltA* de 327 pb (La Scola, 2003).

La longitud de las secuencias del presente estudio abarcó 200 pb, lo cual no permite declarar una nueva especie de *Bartonella*, sin embargo, la longitud de las ramas en el árbol filogenético se traduce en diversos cambios de tipo evolutivo en las secuencias del presente estudio (Hall, 2013), por lo cual podría decirse que se trata de un nuevo linaje de *Bartonella* que no coincide con lo reportado previamente acerca del género *Lutzomyia* (como es el caso de *B. bacilliformis* asociada a *Lu. verrucarum* en países de Sudamérica). Dado que no existen registros de secuencias de *Bartonella* en *Lutzomyia* en la literatura (Noguchi *et al.*, 1929; Minnick *et al.*, 2014) ni en la base de datos de GenBank, este estudio es el primero en México en reportar la presencia del género *Bartonella* en las especies *Lu. cruciata* y *Lu. shannoni*.

En resumen, cabe mencionar que las especies de *Lutzomyia* reportadas en este estudio presentan hábitos antropofílicos (Cruz-Ruiz *et al.*, 1994), lo cual sugiere estudios adicionales para confirmar o negar un posible riesgo de infección con este nuevo linaje de *Bartonella* a los seres humanos o si podría existir en otros artrópodos, ya que *Bartonella* se ha detectado en pulgas (*Pulex irritans*), dípteros (*Lipoptena cervi* y *Lipoptena mazamae*) y garrapatas (*Ixodes* sp., *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp., *Haemaphysalis* sp.) (Sato *et al.*, 2013). Por otra parte, en el noreste de México se ha registrado la presencia de *Leishmania* en Nuevo León y Tamaulipas; y al haberse detectado recientemente *Bartonella* en *Lutzomyia* queda la pregunta si podría haber coexistencia entre *Leishmania* y *Bartonella* dentro de *Lutzomyia*.

## 8) CONCLUSIONES

### 1. Este estudio es el primero:

1.1 En México en reportar la presencia de *Bartonella* en *Lutzomyia*, con una prevalencia total del 16.2% en el estado de Tamaulipas:

7.9 % en *Lu. cruciata* y 29.6 % en *Lu. shannoni*.

1.2 A nivel mundial en reportar secuencias de *Bartonella* en *Lu. cruciata* y *Lu. shannoni* (y el segundo en reportar el género *Bartonella* en *Lutzomyia*).

2. Las secuencias encontradas en el presente estudio se dividieron en tres haplotipos y se relacionaron al género *Bartonella*. El tercer haplotipo se encontró en cuatro muestras de *Lu. shannoni*, por lo que fue el haplotipo más abundante.
3. Las secuencias obtenidas en el presente estudio están agrupadas a 3 especies de *Bartonella* (*B. tribocorum*, *B. elizabethae* y *B. grahamii*) asociadas a roedores.
4. Las especies de *Lutzomyia* reportadas en este estudio presentan hábitos antropofílicos, por lo que se sugieren más estudios para determinar si existe riesgo de transmisión de este linaje de *Bartonella* al ser humano.

## 9) REFERENCIAS

Alcantara, V., Rolain, J.M., Eduardo, A.G., Raul, M.J., Raoult, D., 2009. Molecular detection of *Bartonella quintana* in human body lice from Mexico City. Clin. Microbiol. Infect. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02176.x

Angkasekwinai, N., Atkins, E.H., Romero, S., Grieco, J., Chao, C.C., Ching, W.M., 2014. An evaluation study of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using recombinant protein Pap31 for detection of antibody against *Bartonella bacilliformis* infection among the Peruvian population. Am. J. Trop. Med. Hyg. 90, 690–696. doi:10.4269/ajtmh.13-0131

Bai, Y., Kosoy, M.Y., Calisher, C.H., Cully, J.F., Collinge, S.K., 2009. Effects of rodent community diversity and composition on prevalence of an endemic bacterial pathogen - *Bartonella*. Biodiversity 10, 3–11. doi:10.1080/14888386.2009.9712856

Battisti, J.M., Lawyer, P.G., Minnick, M.F., 2015. Colonization of *Lutzomyia verrucarum* and *Lutzomyia longipalpis* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) by *Bartonella bacilliformis*, the Etiologic Agent of Carrión's Disease. PLoS Negl Trop Dis 9(10): e0004128. doi:10.1371/journal.pntd.0004128.

Billeter, S.A., Levy, M.G., Chomel, B.B., Breitschwerdt, E.B., 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. Med. Vet. Entomol. 22, 1–15. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x

Birtles, R.J., Harrison, T.G., Saunders, N.A., Molyneux, D.H., 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 1–8. doi:10.1099/00207713-45-1-1

Birtles, R. J., & Raoult, D., 1996. Comparison of Partial Citrate Synthase Gene (*gltA*) Sequences for Phylogenetic Analysis of *Bartonella* Species. Int. J. Syst. Bacteriol. 1147, 33–891. doi:10.1099/00207713-46-4-891

Bonilla, D.L., Kabeya, H., Henn, J., Kramer, V.L., Kosoy, M.Y., 2009. *Bartonella quintana* in body lice and head lice from homeless persons, San Francisco, California, USA. Emerg. Infect. Dis. 15, 912–915. doi:10.3201/eid1506.090054

Breitschwerdt, E.B., Atkins, C.E., Brown, T.T., Kordick, D.L., Snyder, P.S., 1999. *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3618–3626.

Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L., 2000. *Bartonella* infection in animals: Carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 428–438. doi:10.1128/CMR.13.3.428-438.2000

Brenner, D.O.N.J., Connor, S.P.O., Winkler, H.H., Steigerwalt, A.G., 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:777–786.

Brenner, D.J., O'Connor, S.P., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Steigerwalt, A.G., 1991. Molecular characterization and proposal of a neotype strain for *Bartonella bacilliformis*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1299–1302.

Buchanan, E. D., & R. E. Buchanan. 1938. *Bacteriology*. MacMillan Co., New York, N.Y.

Buffet, J. P., Kosoy, M., & Vayssier-Taussat, M., 2013. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future microbiology*, 8(9), 1117-1128. doi:10.2217/fmb.13.77

Caceres, A.G., Galat, E.A., Le, Pont.F., 1997. Possible role of *Lutzomyia maranonensis* and *Lutzomyia robusta* (Diptera: Psychodidae) as vectors of human bartonellosis in three provinces of Region Nor Oriental del Maranon, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39: 51–52. doi: 10.1590/s0036-46651997000100011

Chatterjee, P., Chandra, S., Biswas, T., 2015. Daniel Alcides Carrion (1857–1885) and a history of medical martyrdom. *J. Med. Biogr.* 23, 224–227. doi:10.1177/0967772013479532

Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Breitschwerdt, E.B., Kasten, R.W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R.J., Koehler, J.E., Dehio, C., 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet. Res.* 40. doi:10.1051/vetres/2009011

Chomel, B.B., Kasten, R.W., Sykes, J.E., Boulouis, H.-J., Breitschwerdt, E.B., 2003. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 267–78. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07376.x

Cruz-Ruiz, A. L., García-Rejón, J., Manrique-Saide, P., & Pérez-Mutul, J. (1994). Taxonomical identification of anthropophilic species of *Lutzomyia* in Quintana Roo, Peninsula of Yucatán, Mexico. *Rev Biomed*, 5, 127-131.

Cueto, M., 1996. Tropical medicine and bacteriology in Boston and Peru: studies of Carrión's disease in the early twentieth century. *Med. Hist.* 40, 344–364. doi:10.1017/S0025727300061330

DeFoliart, G. R., Grimstead, P. R., & Watts, D. M., 1987, Advances in mosquito-borne arbovirus/vector research, *Ann. Rev. Entomol.* 32:479–505

Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. (1997). Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalization of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J. Cell Sci.* 110:2141–2154.

Diddi, K., Chaudhry, R., Sharma, N., Dhawan, B., 2013. Strategy for identification & characterization of *Bartonella henselae* with conventional & molecular methods. *Indian J. Med. Res.* 137, 380–387.

Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 23–35. doi:10.1038/nrmicro1063

Eldridge, B. F., & Edman, J. (Eds.). 2012. *Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods.* Springer Science & Business Media.

Ellis, B.A., Rotz, L.D., Leake, J.A.D., Samalvides, F., Bernable, J., Ventura, G., Padilla, C., Villaseca, P., Beati, L., Regnery, R., Childs, J.E., Olson, J.G., Carrillo, C.P., 1999. An outbreak of acute Bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 344–349.

Fernández-González, A.M., Kosoy, M.Y., Rubio, A. V., Graham, C.B., Montenieri, J.A., Osikowicz, L.M., Bai, Y., Acosta-Gutiérrez, R., Ávila-Flores, R., Gage, K.L., Suzán, G., 2016. Molecular survey of *Bartonella* species and *Yersinia pestis* in rodent fleas



(Siphonaptera) from Chihuahua, Mexico. *J. Med. Entomol.* 53, 199–205. doi:10.1093/jme/tjv181

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., & Jurtshuk, P. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Evol Microbiol*, January 1992 42: 166-170, doi: 10.1099/00207713-42-1-166

Fournier, P.E., Drancourt, M., Aboudharam, G., Raoult, D., 2015. Paleomicrobiology of *Bartonella* infections. *Microbes Infect.* 17, 879–883. doi:10.1016/j.micinf.2015.09.002

García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Libros n° 6. México, D.F. 90 pp.

Garrity, G., Staley, J. T., Boone, D. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. A., & Schleifer, K. H., 2006. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*. D. J. Brenner, & N. R. Krieg (Eds.). Springer Science & Business Media.

Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Greene, C., Glaus, B., Wolfensberger, C., & Lutz, H. 1997. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2883–2885.

Godínez-Álvarez, A., Ibáñez-Bernal, S., 2010. Catálogo de psychodidae (diptera) de la colección de artrópodos con importancia médica del indre, Secretaría de Salud, México. *Acta Zoológica Mex.* 26, 99–121.

Gutiérrez, R., Krasnov, B., Morick, D., Gottlieb, Y., Khokhlova, I.S., Harrus, S., 2015. *Bartonella* infection in rodents and their flea ectoparasites: an overview. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 27–39. doi:10.1089/vbz.2014.1606

Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Girard, B., Guillot, J., Chomel, B., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H.J., 2004. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6302–6305. doi:10.1128/AEM.70.10.6302-6305.2004

Hall, B. G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* 30 (5): 1229-1235. doi: 10.1093/molbev/mst012

Harms, A., & Dehio, C. 2012. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. Clin. Microbiol. Rev. January 2012 vol. 25 no. 1 42-78. doi: 10.1128/CMR.05009-11

Harms, C.A., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., Clemons-Chevis, C.L., Solangi, M., Rotstein, D.S., Fair, P.A., Hansen, L.J., Hohn, A.A., Lovewell, G.N., McLellan, W.A., Ann Pabst, D., Rowles, T.K., Schwacke, L.H., Townsend, F.I., Wells, R.S., 2008. *Bartonella* species detection in captive, stranded and free-ranging cetaceans. Vet. Res. 39, 1–8. doi:10.1051/vetres:2008036

Heller, R., Artois M., Xemar V., De Briel D., Gehin H., Jaulhac B., Monteil H., Piemont Y., 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. J. Clin. Microbiol. 35:1327–1331.

Hertig, M., Fairchild G.B., 1948. The Control of Phlebotomus in Peru with, DDT. Am J Trop Med Hyg 28: 207–230.

Houpikian, P., Raoult, D., 2001. Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? FEMS Microbiol. Lett. 200, 1–7. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10684.x

Ibáñez-Bernal, S., 2000. Psychodidae (Diptera), pp. 607–626. En: Llorente-Bousquets, J., E. González-Soriano & N. Papavero (Comps.). Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su Conocimiento. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Ibáñez-Bernal, S., 2005a. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* França. Folia Entomol. Mex., 44(2): 195-212

Ibáñez-Bernal, S., 2005b. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V.- Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* França. Folia Entomol. Mex., 44(1): 49-66.

Inoue, K., Kabeya, H., Shiratori, H., Ueda, K., Kosoy, M.Y., Chomel, B.B., Boulouis, H.J., Maruyama, S., 2010. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from *Apodemus* mice. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 759–763. doi:10.1099/ijs.0.011528-0

Jacomo, V., Kelly, P.J., Raoult, D., 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 8–18. doi:10.1128/CDLI.9.1.8

Kaiser, P. O., Riess, T., O'Rourke, F., Linke, D., & Kempf, V. A. (2011). *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. Int. J. Med. Microbiol. 301, 7–15. doi:10.1016/j.ijmm.2010.06.004

Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J.D., Barroso, P.A., Gomez, E.A., Mimori, T., Korenaga, M., Iwata, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72, 87–93. doi:72/1/87

Kempf, V. A. J., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I. and Autenrieth, I. B. 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cell. Microbiol, 2: 431–441. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00072.x

Keret, D., Giladi, M., Kletter, Y., Wientroub, S., 1998. Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. J. Bone Joint Surg. Br. 80, 766–7. doi:10.1302/0301-620X.80B5.8823

Kosoy, M., Bai, Y., Sheff, K., Morway, C., Baggett, H., Maloney, S.A., Boonmar, S., Bhengsi, S., Dowell, S.F., Sitdhirasdr, A., Lerdthusnee, K., Richardson, J., Peruski, L.F., 2010. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 1140–1145. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0778

Kosoy, M., Hayman, D.T.S., Chan, K.S., 2012. *Bartonella* bacteria in nature: Where does population variability end and a species start? Infect. Genet. Evol. 12, 894–904. doi:10.1016/j.meegid.2012.03.005

Kosoy, M., Morway, C. 2008. *Bartonella* in rodent fleas from New Mexico.

La Scola, B., Raoult, D., 1999. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: A 5-year experience (1993 to 1998). J. Clin. Microbiol. 37, 1899–1905.

La Scola, B., Zeaiter, Z., Khamis, A., Raoult, D., 2003. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. Trends Microbiol. 11, 318–321. doi:10.1016/S0966-842X(03)00143-4

La, V.D., Tran-Hung L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M., 2005. *Bartonella quintana* in domestic cat. Emerg Infect Dis. doi.org/10.3201/eid1108.050101

La, V.D., Clavel, B., Lepetz, S., Aboudharam, G., Raoult, D., Drancourt, M., 2004. Molecular detection of *Bartonella henselae* DNA in the dental pulp of 800-year-old French cats. Clin. Infect. Dis. 39, 1391–1394. doi:10.1086/424884

Maggi, R.G., Harms, C. a, Hohn, A. a, Pabst, D.A., McLellan, W. a, Walton, W.J., Rotstein, D.S., Breitschwerdt, E.B., 2005. *Bartonella henselae* in porpoise blood. Emerg. Infect. Dis. 11, 1894–1898. doi:10.3201/eid1112.050969

Maguiña, C., Gotuzzo, E., 2000. BARTONELLOSIS: New and old. Infect. Dis. Clin. North Am. 14, 1–22. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70215-4

Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. Med. Vet. Entomol. 27, 123–147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x

Mascarelli, P.E., McQuillan, M., Harms, C.A., Harms, R. V., Breitschwerdt, E.B., 2014. *Bartonella henselae* and *B. koehlerae* DNA in Birds. Emerg. Infect. Dis. 20, 490–492. doi:10.3201/eid2003.130563

Maurin, M., Roux, V., Stein, A., Ferrier, F., Viraben, R., Raoult, D., 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. J Clin Microbiol; 32: 1166-71.

McPherson, M. J., Moller S.G. (2000). PCR. Springer-Verlag New York.

Mediannikov, O., Ivanov, L., Zdanovskaya, N., Vysochina, N., Fournier, P.E., Tarasevich, I., Raoult, D., 2005. Molecular screening of *Bartonella* species in rodents from the Russian Far East. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063, 308–311. doi:10.1196/annals.1355.049

Minnick, M.F., Anderson, B.E., Lima, A., Battisti, J.M., Lawyer, P.G., Birtles, R.J., 2014. Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. PLoS Negl Trop Dis 8(7): e2919. doi:10.1371/journal.pntd.0002919

Morse, S.F., Olival, K.J., Kosoy, M., Billeter, S., Patterson, B.D., Dick, C.W., Dittmar, K., 2012. Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). Infect. Genet. Evol. 12, 1717–1723. doi:10.1016/j.meegid.2012.06.009

Noguchi, B.Y.H., Shannon, R.C., Tilden, E.B., Tyler, J.R., 1929. Etiology of Oroya Fever: Xiv. The Insect Vectors of Carrion's Disease. J Exp Med 49: 993–1008. PMID: 19869598

Norman, A.F., Regnery, R., Jameson, P., Greene, C., Krause, D.C., 1995. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J. Clin. Microbiol. 33, 1797–1803.

Paziewska, A., Harris, P.D., Zwolińska, L., Bajer, A., Siński, E., 2011. Recombination Within and Between Species of the Alpha Proteobacterium *Bartonella* Infecting Rodents. Microb. Ecol. 61, 134–145. doi:10.1007/s00248-010-9735-1

Peters, D., Wigand, R., 1955. Bartonellaceae. Bacteriol. Rev. 19:150-155.

Raoult, D., Dutour, O., Houhamdi, L., Jankauskas, R., Fournier, P.-E., Ardagna, Y., Drancourt, M., Signoli, M., La, V.D., Macia, Y., Aboudharam, G., 2006. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. J. Infect. Dis. 193, 112–20. doi:10.1086/498534

Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Annu. Rev. Entomol. 58, 227–250. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153557

Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. (2011) Vector Competence of the Tick *Ixodes ricinus* for Transmission of *Bartonella birtlesii*. PLoS Negl Trop Dis 5(5): e1186. doi:10.1371/journal.pntd.0001186

Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B., Raoult, D., 2003. Molecular Detection of *Bartonella* Cat Fleas, France. Emerg. Infect. Dis. 9, 0–4.

Rodríguez-Rojas, J.J., 2012. Aspectos ecológicos de los vectores de leishmaniasis (Diptera: Psychodidae), de la tripanosomiasis americana (Hemiptera: Reduviidae) y de sus reservorios (Mammalia: Rodentia) en localidades selectas de Nuevo León y Tamaulipas,

México, Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, 84 pp.

Romero-cabello, R., Romero-feregrino, R., Romero-feregrino, R., Sánchez, J., Lazos-choa, M., 2016. Angiomatosis bacilar: reporte de un caso 63, 119–123.

Rubio, A. V, Avila-Flores, R., Osikowicz, L.M., Bai, Y., Suzán, G., Kosoy, M.Y., 2014. Prevalence and genetic diversity of *bartonella* strains in rodents from northwestern Mexico. Vector Borne Zoonotic Dis. 14, 838–45. doi:10.1089/vbz.2014.1673

Rzedowski, J., 1978. Vegetación de México. Limusa, México.

Sanchez-Clemente, N., Ugarte-Gil, C.A., Solórzano, N., Maguiña, C., Pachas, P., Blazes, D., Bailey, R., Mabey, D., Moore, D., 2012. *Bartonella bacilliformis*: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination. PLoS Negl. Trop. Dis. 6. doi:10.1371/journal.pntd.0001819

Sánchez-Montes, S., Guzmán-Cornejo, C., Herrera-Montalvo, G., Richman, A., Flores-Martínez, J.J., García-Ruiz, G., Berzunza-Cruz, M., Gaytán-Colín, P., Pérez-Montfort, R., Alcántara-Rodríguez, V., Becker, I. 2016a. First Record of *Bartonella vinsonii* in the Sucking Louse *Hoplopleura hirsuta* Collected from Hispid Cotton Rats, *Sigmodon hispidus*, in Mexico. Southwest. Entomol.

Sánchez-Montes, S., Guzmán-Cornejo, C., Martínez-Nájera, Y., Becker, I., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2016b. *Rickettsia lusitaniae* associated with *Ornithodoros yumatensis* (Acari: Argasidae) from two caves in Yucatan, Mexico. Ticks Tick. Borne. Dis. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.09.003

Sato, S., Kabeya, H., Fujinaga, Y., Inoue, K., Une, Y., Yoshikawa, Y., Maruyama, S., 2013. *Bartonella jaculi* sp. nov., *Bartonella callosciuri* sp. nov., *Bartonella pachyuromydis* sp. nov. and *Bartonella acomydis* sp. nov., isolated from wild Rodentia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 1734–1740. doi:10.1099/ijs.0.041939-0

Schulte Fishedick, F.B., Stuckey, M.J., Aguilar-Setién, A., Moreno-Sandoval, H., Galvez-Romero, G., Salas-Rojas, M., Arechiga-Ceballos, N., Overgaauw, P.A.M., Kasten, R.W., Chomel, B.B., 2016. Identification of *Bartonella* Species Isolated from Rodents from Yucatan, Mexico, and Isolation of *Bartonella vinsonii* subsp. *yucatanensis* subsp. nov. Vector-Borne Zoonotic Dis. 16, vbz.2016.1981. doi:10.1089/vbz.2016.1981

Schultz, M.G., 1968. A history of bartonellosis (Carrion's disease). *Am J Trop Med Hyg*; 17: 503-515. (2)

Simpson, M. H., Mullins F. & Stone O. J., 1968. Deseminated anergic cutaneous leishmaniasis. An autochthonous case in Texas and the Mexican states of Tamaulipas and Nuevo Leon. *Archives of Dermatology*. 97(3): 301-303. doi:10.1001/archderm.1968.01610090073011

Stackebrandt, E., Goebel, B. M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 44(4), 846-849.

Storz, J., & Page, L. A. (1971). Taxonomy of the *Chlamydiae*: Reasons for Classifying Organisms of the Genus *Chlamydia*, Family Chlamydiaceae, in a Separate Order, Chlamydiales ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 21(4), 332-334.

Strong, R.P., Tyzzer, E.E., Brues, C.T., Sellards, A.W., Gastiaberger, K.C., 1913. Verruga peruviana, Oroya fever and Uta. *J. Am. Med. Assoc.* 61:1713-1716.

Service, M.W., 1980. A guide to medical entomology. (Macmillan, Ed.) Minnesota: London & Basingstoke: Macmillan Press.

Sistema Único de Información y Vigilancia Epidemiológica (SUIVE). Secretaria de Salud (SSA). Publicaciones de la Dirección General de Epidemiología.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* Dec; 30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197.

Tran, T.N.N., Forestier, C. Le, Drancourt, M., Raoult, D., Aboudharam, G., 2011. Brief communication: Co-detection of *Bartonella quintana* and *Yersinia pestis* in an 11th-15th burial site in Bondy, France. *Am. J. Phys. Anthropol.* 145, 489–494. doi:10.1002/ajpa.21510

Tsai, Y.L., Chang, C.C., Chuang, S. Te, Chomel, B.B., 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. doi:10.1016/j.cimid.2011.04.005

Valdizán, H., 1925. Apuntes para una bibliografía peruana de la enfermedad de Carrión. *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 11, No. 2, pp. 45-85).

Valentine, K.H., Harms, C. a, Cadenas, M.B., Birkenheuer, A.J., Marr, H.S., Braun-McNeill, J., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B., 2007. *Bartonella* DNA in loggerhead sea turtles. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 949–950. doi:10.3201/eid1306.061551

Vega-López, C.A., Orzechowsky Rallo, A., Ariza Andraca, R., Ponce De LeónGarduño, L.A., 2010. Enfermedad por arañazo de gato. A propósito del caso de un hombre de 32 años. *Med. Interna Mex.* 26, 410–413.

Verano, J. W., 1997. Advances in the paleopathology of Andean South America. *J. World Prehist.*, 11(2), 253.

Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomology Institute*, 54: 1-881.

Zeaiter, Z., Liang, Z., Raoult, D., 2002. Genetic Classification and Differentiation of *Bartonella* Species Based on Comparison of Partial *ftsZ* Gene Sequences Genetic Classification and Differentiation of *Bartonella* Species Based on Comparison of Partial *ftsZ* Gene Sequences 40, 3641–3647. doi:10.1128/JCM.40.10.3641

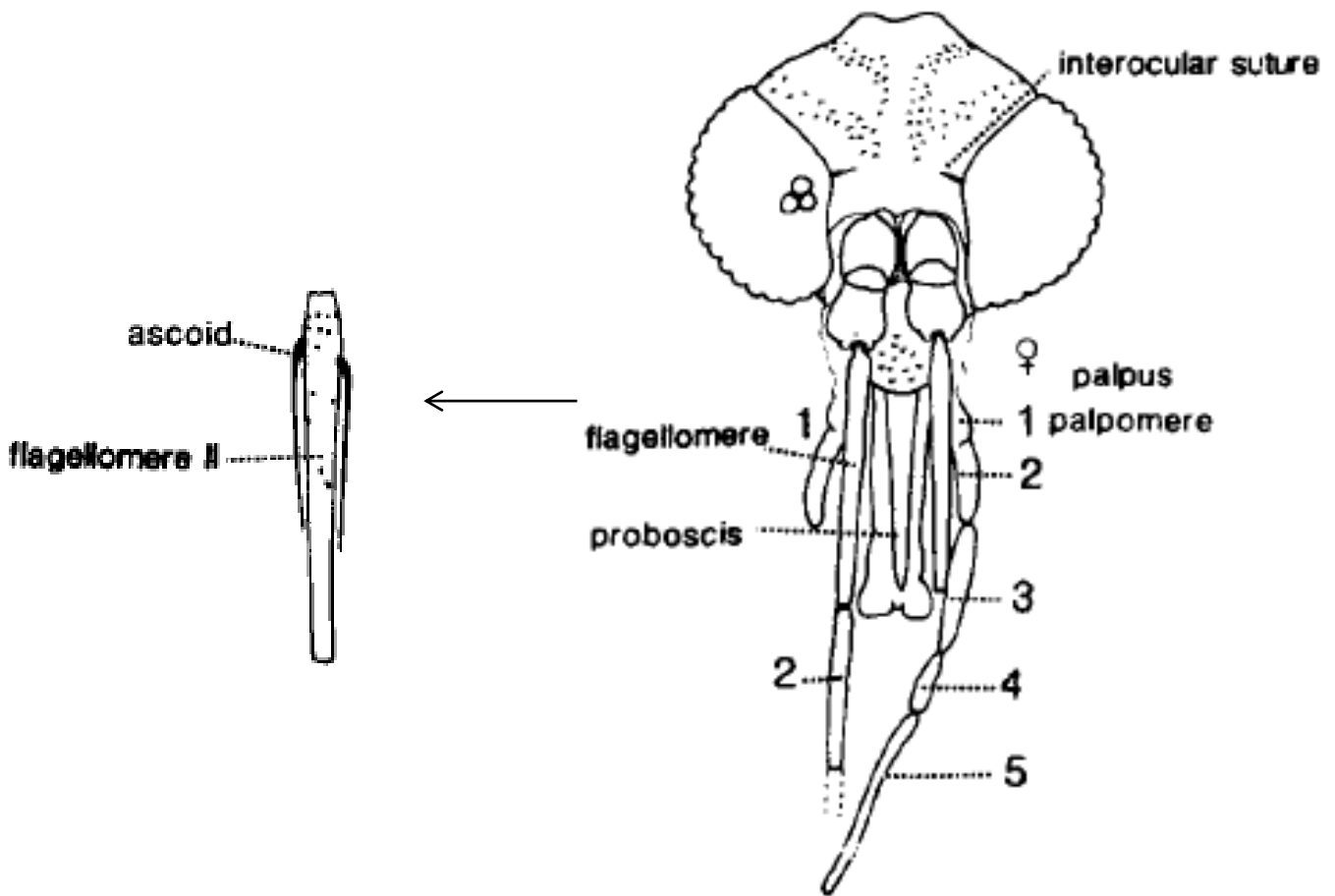


## 10) APÉNDICE

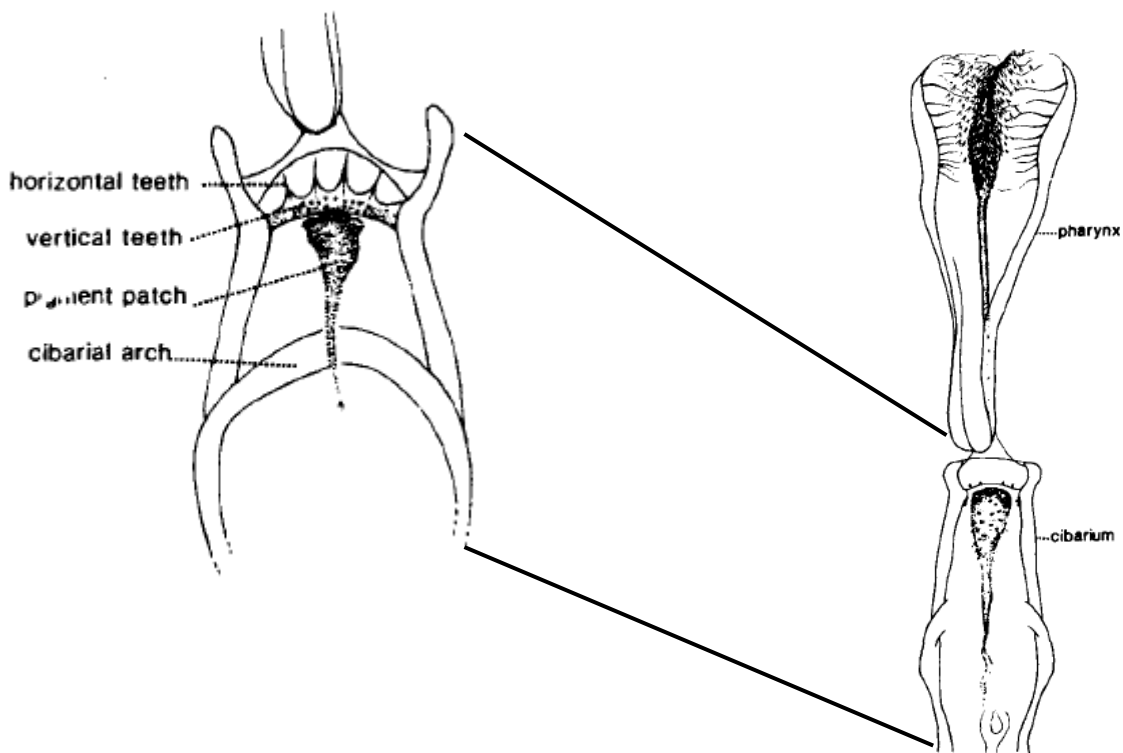
### 10.1 Trabajo de campo

#### 10.1.1 Proceso curatorial para el montaje de los flebotominos

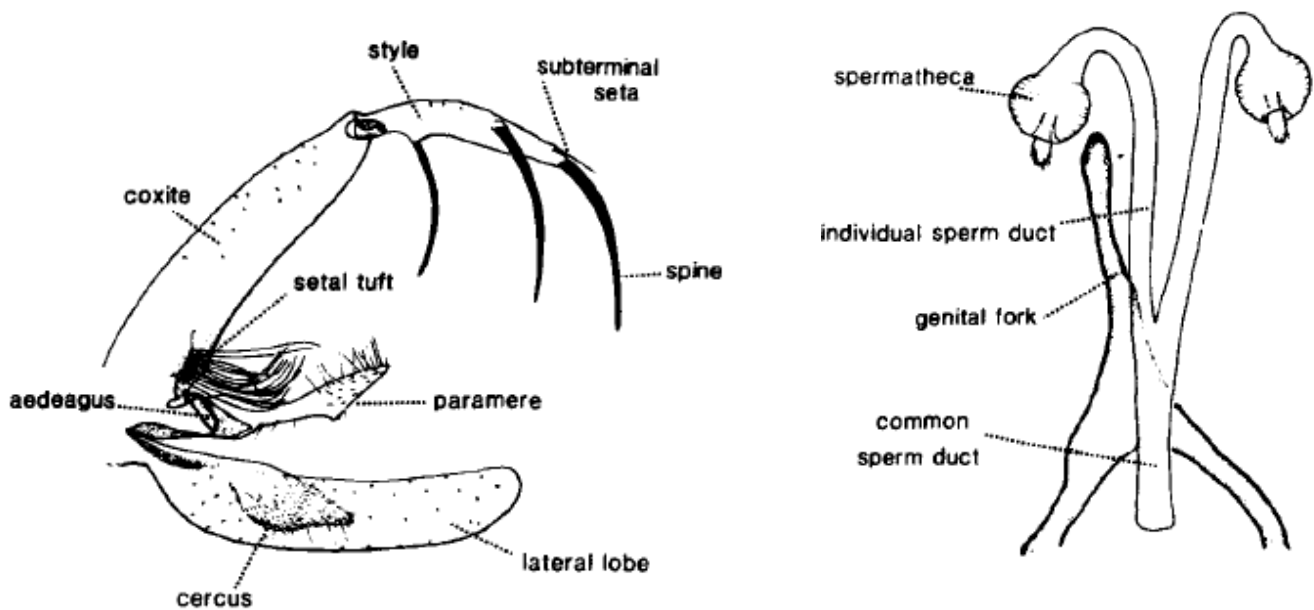
La identificación de las especies de *Lutzomyia* se realizó con base en las características morfológicas más importantes: la genitalia, el cibario, la faringe, los flagelómeros, ascoides y la longitud de la probóscide respecto a los palpos y a los flagelómeros.



**Figura 9.** Morfología de la cabeza de *Lutzomyia* sp. A la izquierda se encuentra un flagelómero con ascoides (estructuras sensoriales de importancia taxonómica), y a la derecha las estructuras de la cabeza: Ojos prominentes cubiertos de omatidios; la probóscide rodeada de antenas pareadas compuestas de 14 flagelómeros con ascoides y palpos pareados compuestos por cinco palpómeros (Tomado de Young & Duncan, 1994).



**Figura 10.** Morfología de la faringe y el cibario de *Lutzomyia* (Tomado de Young & Duncan, 1994).



**Figura 11.** Genitalia masculina de *Lutzomyia* (izquierda); espermateca femenina (derecha) (Tomado de Young & Duncan, 1994).

Se realizaron preparaciones permanentes para la identificación de los flebotominos; las preparaciones de las hembras sólo contienen la cabeza, las alas y los últimos segmentos del abdomen debido a que el tórax y el resto del abdomen se utilizaron para realizar PCR (Young & Duncan, 1994).

Se depositó el contenido del vial que contenía al flebotomino en una caja petri, en donde se sustituyó lentamente el etanol al 70% por agua, dejándolo durante 10 minutos. Posteriormente, el ejemplar se traspasó a otra caja petri con agua destilada y se colocó en hidróxido de sodio (NaOH al 10%) o potasio (KOH) con el objetivo de eliminar los tejidos blandos, dejándolo reposar al menos durante 12 horas o hasta que el ejemplar estuviera translúcido. Para eliminar todo el NaOH (o KOH) se lavaron los ejemplares con agua destilada durante 30 minutos, y después se deshidrataron gradualmente al pasarlos por alcohol al 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% durante 15 minutos en cada uno (Ibáñez-Bernal, 2005a, 2005b).

Después del alcohol absoluto se diafanizaron en esencia de clavo puro durante una hora o hasta observar el ejemplar translúcido. Posteriormente se realizó un montaje por inversión: se fijó un cubreobjetos a un portaobjetos con una gota de agua bidestilada, luego se le colocó Euparal y se transfirió al ejemplar para la disección bajo el microscopio estereoscópico: mediante agujas entomológicas el tórax fue separado de la cabeza y las alas, las cuales se extendieron por separado; se orientaron las antenas y los palpos extendidos hacia abajo.

El cuerpo se colocó de lado izquierdo ventral y la terminalia en vista lateral. La muestra se dejó por lo menos 24 h a 37-40 °C y para completar la preparación, se separó el cubreobjetos del portaobjetos, se colocó una gota de Euparal al centro del portaobjetos y se invirtió el cubreobjetos. Una vez que la preparación se secó se procedió a limpiarla y se etiquetó con los datos de colecta (Ibáñez-Bernal, 2005a, 2005b).

### 10.1.2 Extracción de DNA de *Lutzomyia*

Se realizó la extracción del DNA mediante la técnica de Fenol cloroformo, para lo cual se requirió la preparación de diferentes tipos de Buffer:

Buffer A: Se mezclaron las cantidades del stock y se aforaron a 200 mL con agua destilada.

50mM de glucosa (Stock 1M ----- 10 mL)

25mM Tris HCL pH8 (Stock 1M ----- 5 mL)

10 mM EDTA pH8 (Stock 0.5M ----- 4 mL)

Buffer B: Se mezclaron las cantidades del stock y se aforó a 100 mL con agua destilada.

0.2N de NaOH (Stock 1N ----- 20 mL)

1% SDS (Stock ----- 10 mL)

Buffer C: Se mezclaron las cantidades del stock y se aforó a 100 mL con agua destilada.

5M de acetato de potasio (Stock ----- 60 mL)

Ácido acético glaciado (11.5 mL)

Para la extracción de DNA, se retiró el alcohol de la muestra y se depositó en un tubo limpio, en donde fue macerada con 100  $\mu$ L del buffer A utilizando el pistilo con rotor. En seguida se adicionaron 100  $\mu$ L del buffer B y se incubó a 65 °C en un equipo Multi-block durante 10 minutos, con agitación ligera, que consistió en invertir el tubo y regresarlo a su posición original lentamente. Se adicionaron 100  $\mu$ L del buffer C y se mezcló en vórtex durante un 1 minuto, luego se incubó en hielo durante 5 minutos.

La muestra fue centrifugada a 20,800 xg (14,000 rpm) durante 2 minutos a 4°C, y se recuperó la fase acuosa formada en la parte superior del tubo, la cual fue transferida a un tubo nuevo y se le añadió 1 volumen (300  $\mu$ L) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para mezclar vigorosamente con vórtex y centrifugar 20,800 g (14,000 rpm) durante 2 minutos a 4°C. Se recuperó nuevamente la fase acuosa, se depositó en un tubo nuevo y se le agregó 60  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 5.2, posteriormente se mezcló por inversión y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto (600  $\mu$ L); esta mezcla se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Al día siguiente, la muestra fue centrifugada a 20,800 xg (14,000 rpm) durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 1 mL de etanol frío y se mezcló por inversión para centrifugarlo a 20,800 g (14,000 rpm) durante 5 minutos a 4°C. Luego se invirtió el tubo para descartar el etanol y se dejó en esta posición sobre una sanita de papel. Posteriormente se dejó secando el tubo en el Multi-block para eliminar cualquier residuo de etanol; mientras tanto, en el mismo aparato se calentó agua inyectable durante 15 minutos, de la cual se adicionaron 30 µL al tubo con la muestra de DNA y se incubó durante 10 minutos; por último, la muestra se almacenó a 4°C.

### **10.1.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Para comprobar la presencia de DNA después de la PCR se realizaron geles de agarosa al 1.5% de la siguiente manera: se pesaron 1.5 g de agarosa y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de TAE 1X, la mezcla fue calentada en un horno de microondas a intervalos de 3 minutos hasta observar la completa disolución de la agarosa. Una vez realizado esto se agregó 1.5 µL de agente intercalante SYTO<sup>®</sup> 60 (Invitrogen) y se agitó suavemente para incorporarlo a la agarosa antes de depositarla en la cámara de electroforesis.

Posteriormente se le colocó un peine a la agarosa para la formación de los pozos, se cerró la cámara de electroforesis y se cubrió para proteger el gel de la luz; después de media hora se retiraron los peines del gel y se agregó TAE 1x (Tris ácido acético EDTA) hasta cubrirlo, luego se cargaron los productos de PCR en los pozos y el marcador de peso molecular LMW DNA Ladder (Invitrogen) se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder utilizándose un voltaje constante de 75V durante 40 minutos aproximadamente.

Después el gel se transfirió al equipo Odyssey<sup>®</sup> CLx, el cual es un escáner capaz de producir imágenes a partir de la excitación de moléculas fluorescentes utilizando el canal de 700 nm (ya que el SYTO 60 tiene una fluorescencia de absorción y emisión a 652/678 nm). Una vez obtenida la lectura se realizó un registro fotográfico y se limpió el equipo con agua desionizada y metanol.

**10.2 Tabla 6. Relación de secuencias de especies de *Bartonella* utilizadas en el análisis filogenético y fenético (La Scola *et al.*, 2003).**

<b>Especie</b>	<b>Fuente</b>	<b>País de aislamiento</b>	<b>Clave</b>
<i>B. alsatica</i> (IBS382T)	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	Alsace, Francia	AF204273
<i>B. bacilliformis</i> (KC584T)	Cultivo (cepa original: Sangre humana)	Estados Unidos	U28076
<i>B. birtlesii</i> (IBS 325T)	<i>Apodemus sp.</i>	Gerstheim, Francia	AF204272.1
<i>B. bovis</i> (91-4T)	<i>Bos primigenius taurus</i>	Paris, Francia	AF293394
<i>B. clarridgeiae</i> (Houston-2T)	<i>Felis catus</i>	Texas, Estados Unidos	U84386
<i>B. doshiae</i> (R18T)	<i>Apodemus sylvaticus</i> ; <i>Clethrionomys glareolus</i>	Inglaterra	AF207827
<i>B. elizabethae</i> (F9251T)	Cultivo ( <i>Homo sapiens</i> )	Estados Unidos	U28072
<i>B. grahamii</i> (V2T)	Cultivo ( <i>Clethrionomys glareolus</i> )	Francia	Z70016
<i>B. henselae</i> (Houston-1T)	Cultivo ( <i>Homo sapiens</i> )	Estados Unidos	L38987
<i>B. koehlerae</i> (C-29T)	<i>Felis catus</i>	San Francisco, Estados Unidos	AF176091
<i>B. quintana</i> (FullerT)	Cultivo ( <i>Homo sapiens</i> )	Francia	Z70014
<i>B. schoenbuchensis</i> (R1T)	Sangre de corzo: <i>Capreolus capreolus</i>	Alemania	AJ278183
<i>B. taylorii</i> (M6T)	Cultivo ( <i>Apodemus spp</i> )	Inglaterra	AF191502
<i>B. tribocorum</i> (IBS 506T)	<i>Rattus norvegicus</i>	Francia	AJ005494.1
<i>Bartonella vinsonii subsp. arupensis</i> (OK 94-513T)	Cultivo ( <i>Homo sapiens</i> )	Francia	AF214557
<i>Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii</i> (93-CO1T)	Cultivo ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	Estados Unidos	U28075
<i>Bartonella vinsonii subsp. vinsonii</i> (BakerT)	Cultivo ( <i>Homo sapiens</i> )	Francia	Z70015

**10.3 Tabla 7. Relación de secuencias de *Bartonella* sp., detectadas en diversos organismos (vectores y hospederos) de México.**

Organismo	Relación con <i>Bartonella</i>	Número de acceso <i>Bartonella</i> sp.	Referencia
<i>Meringis parkeri</i>	Vector	KM243759.1	Fernandez-Gonzalez <i>et al.</i> , (2014).
<i>Orchopeas leucopus</i>	Vector	KM243758.1	
<i>Dipodomys merriami</i>	Hospedero	KJ719298.1	Rubio <i>et al.</i> , (2014).
<i>Dipodomys merriami</i>		KJ719297.1	
<i>Dipodomys spectabilis</i>		KJ719296.1	
<i>Dipodomys merriami</i>		KJ719295.1	
<i>Dipodomys merriami</i>		KJ719294.1	
<i>Dipodomys spectabilis</i>		KJ719293.1	
<i>Dipodomys merriami</i>		KJ719292.1	
<i>Dipodomys spectabilis</i>		KJ719291.1	
<i>Dipodomys spectabilis</i>		KJ719290.1	
<i>Cynomys ludovicianus</i>		KJ719289.1	
<i>Spermophilus spilosoma</i>		KJ719288.1	
<i>Neotoma albigula</i>		KJ719287.1	
<i>Neotoma albigula</i>		KJ719286.1	
<i>Onychomys arenicola</i>		KJ719285.1	
<i>Onychomys arenicola</i>		KJ719284.1	
<i>Hoplopleura hirsuta</i>	Vector	KP997205.1	Sánchez-Montes <i>et al.</i> , (2016a).
<i>Orchopeas sexdentatus</i>	Vector	EU549693.1	Kosoy & Morway, (2016).
<i>Trichobius johnsonae</i>	Vector	JX416248.1	Morse <i>et al.</i> , (2012).
<i>Strebla mirabilis</i>	Vector	JX416233.1	

**10.4 Tabla 8. Colecta realizada en Nuevo León, en los municipios de Santiago (-100.1418, 25.2254) y Cadereyta Jiménez (-99.5823, 25.2235).**

	<b>Colecta</b>	<b>Municipio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Especie de <i>Lutzomyia</i></b>	<b>Clave</b>	<b>18S</b>
1	21-jun-10	Santiago	Ciénega de González	<i>Lutzomyia diabolica</i>	1	N
2	21-jun-10	Santiago	Ciénega de González	<i>Lutzomyia diabolica</i>	1a	P
3	21-jun-10	Santiago	Ciénega de González	<i>Lutzomyia diabolica</i>	7b	P
4	21-jun-10	Santiago	Ciénega de González	<i>Lutzomyia diabolica</i>	5a	N
5	23-jun-10	Santiago	Ciénega de González	<i>Lutzomyia cruciata</i>	5b	P
6	27-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia texana</i>	17a1	P
7	28-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia sp.</i>	15a1	P
8	28-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia texana</i>	16a	P
9	28-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia texana</i>	12a	P
10	29-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia vindicator</i>	12b	P
11	29-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia vindicator</i>	12c	P
12	29-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia texana</i>	4a	P
13	29-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia anthophora</i>	4b	P
14	30-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia sp.</i>	8*	P
15	27-ag-10	Cadereyta Jiménez	Rincón de los Sabinos	<i>Lutzomyia texana</i>	3	P



**10.5 Tabla 9. Colecta realizada en el estado de Tamaulipas, municipio de Gómez Farías, cerca del Centro Interpretativo Ecológico (-99.10163, 23.0417) (18 S: P indica presencia de DNA)**

	<b>Fecha de colecta</b>	<b>Especie <i>Lutzomyia</i></b>	<b>Clave de muestra</b>	<b>18 S</b>
1	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's a	P
2	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's b	
3	28-30/07/10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc's c	
4	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's d	P
5	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's e	P
6	28-30/07/10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc's f	P
7	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's g	P
8	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cratifer/undulata</i>	cdc's h	P
9	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's i	P
10	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's j	P
11	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's l	P
12	28-30/07/10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc's m	P
13	28-30/07/10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc's n	P
14	29-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc's r	P
15	29-jul-10	<i>Lutzomyia sp.</i>	CH-1	P
16	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-2	P
17	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-3	P
18	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-4	P
19	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-6	P
20	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-7	P
21	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-8	P
22	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-9	P
23	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-10	P
24	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-11	

25	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-13	
26	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-14	P
27	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-15	P
28	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-16	P
29	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-17	P
30	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-18	P
31	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-19	P
32	29-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	CH-21	
33	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	8 <sup>a</sup>	P
34	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	8b	P
35	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	8c	P
36	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	8d	P
37	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	8e	P
38	30-jul-10	<i>Lutzomyia sp.</i>	8g	
39	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	8h	P
40	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	8i	P
41	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	15 <sup>a</sup>	P
42	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	15b	P
43	30-jul-10	<i>Lutzomyia texana</i>	15d	P
44	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	15e	P
45	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	15f	P
46	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	15g	
47	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	17 <sup>a</sup>	P
48	30-jul-10	<i>Lutzomyia deleoni</i>	17b	
49	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	17c	P
50	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	12uno	P
51	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	12dos	P
52	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	12tres	P
53	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	4-uno	P
54	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	4-dos	P

55	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	4-tres	
56	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	6 <sup>a</sup>	
57	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	6b	P
58	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	6c	P
59	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-a	P
60	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	pcr-11-b	P
61	30-jul-10	<i>Lutzomyia sp.</i>	pcr-11-c	P
62	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-e	
63	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-f	P
64	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-g	P
65	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	pcr-11-h	
66	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-i	
67	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-j	P
68	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-k	P
69	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-l	
70	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	pcr-11-m	
71	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-p	
72	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-q	P
73	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-r	
74	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-s	
75	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	pcr-11-t	
76	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-a	P
77	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc-3-b	
78	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-c	P
79	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-d	
80	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc-3-e	P
81	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc-3-f	
82	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc-3-h	P
83	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-i	
84	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-j	

85	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc-3-k	P
86	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-m	
87	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	cdc-3-n	P
88	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	cdc-3-o	
89	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	2 <sup>a</sup>	P
90	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	2b	P
91	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	2c	
92	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	2d	
93	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	2e	
94	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	2f	P
95	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	2h	P
96	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	2i	P
97	30-jul-10	<i>Lutzomyia shannoni</i>	2j	
98	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	2k	P
99	30-jul-10	<i>Lutzomyia cruciata</i>	2l	P