

**Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias**



TESIS:

"IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *Rickettsia rickettsii* EN SANGRE Y GARRAPATAS DE CANINOS DOMÉSTICOS DEL ESTADO DE SINALOA, MÉXICO."

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

MARIO CÉSAR RUBIO ROBLES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SYLVIA PÁZ DÍAZ CAMACHO

ASESORES:

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

DR. IGNACIO OSUNA RAMÍREZ

DR. JESÚS RICARDO PARRA UNDA

Culiacán, Sinaloa, México; a 29 de enero de 2016.

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **MARIO CÉSAR RUBIO ROBLES**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

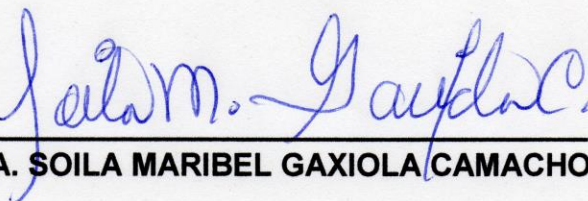
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

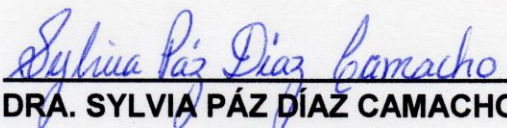


Universidad Autónoma
de Sinaloa
ESCUELA DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CULIACÁN, ROSALES, SINALOA, MEXICO
INVEST. Y POSGRADO

DIRECTORA


DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

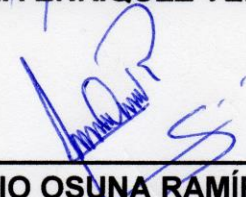
CO-DIRECTORA


DRA. SYLVIA PÁZ DÍAZ CAMACHO

ASESORA


DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESOR


DR. IGNACIO OSUNA RAMÍREZ

ASESOR


DR. JESÚS RICARDO PARRA UNDA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe Dr. Mario César Rubio Robles, egresado del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 1175101-0, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho y Codirección de la Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho, y cede los derechos del trabajo titulado “Identificación Genética de *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas de caninos domésticos del estado de Sinaloa, México.”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Dr. Mario César Rubio Robles

Dr. Mario César Rubio Robles

DOMICILIO: Boulevard Elbert 2840, fracc. Universidad 94-2, Culiacán, Sinaloa, México.
TELÉFONO: 667-1007094
CORREO ELECTRÓNICO: rubio@uas.edu.mx
CURP: RURM660307HSLBBR05



UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

DEDICATORIA

A mi familia,
mi razón de ser.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida y poner cada día sus maravillas para disfrutarlas, por todas las bendiciones que me ha dado, por rodearme de personas especiales y ser parte de una bella familia, porque ha puesto en mi camino personas bondadosas y ejemplos a seguir como seres humanos y profesionistas.

A mis padres por todo su amor y apoyo, ejemplo de honestidad, respeto y esfuerzo que han dado; los amo y siempre están en mí, al igual que mis hermanos Joel, Elizabeth, Cimaty, Iván y Noé, gracias por su comprensión y apoyo inigualable.

Desde lo más sensible de mi ser, el mayor y amoroso agradecimiento para mi hermosa familia, mi amada esposa Coyin (5y2), mis hijas Marian y Ángela y mi pequeño Pablo Cesar, todos mi gran amor e inspiración para ser mejor en todos los ámbitos. Gracias por su comprensión e incondicional apoyo, por entender el motivo por el cual no les he dedicado el tiempo y la atención que deseo y merecen, por enfrentar y compartir juntos todo lo que Dios nos da.

Agradezco enormemente, como siempre he dicho, a mi comité doctoral, sus enseñanzas y ser guías en este proceso de mi formación académica.

Expreso con profundo afecto y respeto mi más sincero agradecimiento a mi Directora de tesis, Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho, por su incansable labor y entrega, su liderazgo para lograr las metas propuestas, su siempre visionario quehacer hacia la excelencia académica y sobre todo por su invaluable apoyo, comprensión y guía en este proceso.

Mi gratitud a la Dra. Sylvia Páz Díaz Camacho, por ser una excelente persona y profesionista ejemplar, por su comprensión, apoyo y su siempre amable y generosa disponibilidad, de todo corazón y como siempre mi mayor respeto y admiración.

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo, mi verdadero y afectuoso agradecimiento por su admirable dedicación, orientación, disponibilidad, paciencia y participación constante e incondicional en el desarrollo de esta tesis, siempre con actitud positiva, motivante, que inunda de ánimo y cariño.

Al Dr. Ignacio Osuna Ramírez gracias por el tiempo dedicado, por su gran disponibilidad, atenciones y orientación.

Dr. Ricardo Parra Unda, agradezco su grandiosa orientación, amabilidad y dedicación para alcanzar los objetivos propuestos.

Agradezco a mis compañeros y amigos del área de Parasitología Veterinaria de la FMVZ-UAS, Nohemí Castro del Campo, Claudia L. Barraza Tizoc, Daniel Solís, Silvia del Carmen Cota Guajardo y Cesar Noé Badilla, por todo el apoyo para la realización de este trabajo.

Muchas gracias a cada uno de los que participaron para llegar a esta etapa.

A todos que Dios nos llene de bendiciones, amor y felicidad.

CONTENIDO	PAGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1.2.1. Generalidades de rickettsiosis.....	3
1.2.1.1. Taxonomía y Filogenia.....	3
1.2.2. FMMR por <i>Rickettsia rickettsii</i>.....	11
1.2.2.1. Impacto en Salud Pública.....	12
1.2.2.2. Ciclo biológico.....	14
1.2.2.3. Transmisión.....	15
1.2.2.3.1. Generalidades de garrapatas.....	15
1.2.2.4. Signos clínicos de FMMR.....	17
1.2.2.5. Diagnóstico de FMMR.....	18
1.2.2.5.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	19
1.2.2.5.2. Cultivo de rickettsias.....	20
1.2.2.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
1.2.3. Diversidad genética.....	22

CAPÍTULO 2. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> EN CANINOS EN SINALOA, MÉXICO.	24
2.1. INTRODUCCIÓN.....	24
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.2.1. Muestreo.....	26
2.2.2. Criterios de Inclusión.....	27
2.2.3. Criterios de exclusión.....	27
2.2.4. Colecta y procesamiento de muestras.....	27
2.2.5. Identificación morfológica de garrapatas.....	27
2.2.6. Extracción de ADN de muestras.....	28
2.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
2.2.8. Purificación de ADN.....	29
2.2.9. Visualización de ADN amplificado y purificado.....	29
2.2.10. Secuenciación.....	29
2.2.11. Análisis <i>In Silico</i>	29
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
CAPÍTULO 3. <i>Rickettsia rickettsii</i> EN SANGRE Y GARRAPATAS DE CANINOS DOMESTICOS DE SINALOA, MÉXICO.	48
3.1. INTRODUCCIÓN.....	48
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.2.1. Muestreo.....	50
3.2.2. Criterios de Inclusión.....	50
3.2.3. Criterios de exclusión.....	50
3.2.4. Colecta y procesamiento de muestras.....	50

3.2.5. Extracción de ADN de muestras.....	51
3.2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
3.2.7. Purificación de ADN.....	52
3.2.8. Visualización de ADN amplificado y purificado.....	52
3.2.9. Secuenciación.....	52
3.2.10. Análisis <i>In Silico</i>	53
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES.....	65
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Titulo	Página
1	Distribución de caninos muestreados en clínicas veterinarias, en las ciudades de Los Mochis, Culiacán y Mazatlán, Sinaloa.	31
2	Agrupación de garrapatas por estadio evolutivo (larva, ninfa y adulto) y sexo (hembra y macho adulto), colectadas de caninos atendidos en clínicas veterinarias, en las ciudades: Los Mochis, Culiacán y Mazatlán, Sinaloa.	33
3	Secuencias obtenidas de la amplificación por PCR de las regiones diana de un fragmento del gen 16S ARNr, de ~460 pb de <i>R. sanguineus</i> en caninos de Sinaloa.	34
4	Alineamiento de secuencias de <i>R. sanguineus</i> en caninos de Sinaloa.	35
5	Matriz de porcentaje de identidad de secuencias de <i>R. sanguineus</i> de caninos en Sinaloa.	37
6	Alineamiento de Secuencias de <i>R. sanguineus</i> Sinaloa comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank.	39
7	Matriz de porcentaje de identidad de secuencias de <i>R. sanguineus</i> de caninos en Sinaloa comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank.	45
8	Secuencias de <i>R. rickettsii</i> obtenidas de garrapatas y caninos de Sinaloa.	54
9	Alineamiento entre secuencias de <i>R. rickettsii</i> obtenidas de caninos y garrapatas de Sinaloa.	55
10	Matriz de porcentaje de identidad entre secuencias de <i>R. rickettsii</i> obtenida de garrapatas y caninos de Sinaloa.	56
11	Alineamiento de secuencias de <i>R. rickettsii</i> en caninos y garrapatas de Sinaloa, comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank, incluyendo depositadas de Yucatán y Mexicali.	57
12	Matriz de porcentaje de identidad de secuencias de <i>R. rickettsii</i> de caninos y garrapatas de Sinaloa, comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank, incluyendo depositadas de Yucatán y Mexicali.	59
13	Matriz de porcentaje de identidad en secuencias de <i>R. rickettsii</i> de caninos y garrapatas de Sinaloa comparadas con Yucatán y Mexicali depositadas en GenBank.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Página
1	Filogenia de <i>Rickettsia spp.</i> utilizando secuencias de los genes <i>atpA</i> , <i>CoxA</i> , <i>gltA</i> y <i>16S rRNA</i> asociada con vectores artrópodos (Weinert <i>et al.</i> , 2009).	5
2	Filogenia de especies de <i>Rickettsia</i> basada en la comparación de secuencias del gen <i>gltA</i> . (Fournier y Raoult, 2005).	7
3	Árbol filogenético de todas las especie reconocidas de <i>Rickettsia</i> , obtenido de un árbol consenso construido con base a las secuencias de las proteínas de membrana externa y la citrato sintasa (Merhej <i>et al.</i> , 2014).	9
4	Distribución geográfica de las principales especies de <i>Rickettsia</i> patógenas transmitidas por garrapatas de los géneros <i>Rhipicephalus</i> , <i>Dermacentor</i> y <i>Amblyomma</i> (Faccini-Martínez <i>et al.</i> 2014).	10
5	Regiones morfológicas para la identificación de <i>R. sanguineus</i> .	28
6	Estadios evolutivos <i>R. sanguineus</i> observadas, con base a claves dicotómicas.	31
7	Visualización en gel agarosa al 2%, de la amplificación del fragmento de ~460 pb del gen <i>16S rRNA</i> de <i>R. sanguineus</i> .	33
8	Filogenia de <i>R. sanguineus</i> en caninos de Sinaloa, comparadas con secuencias en GenBank, mediante sistema de unión de vecinos (<i>Neighbour-joining tree</i> , MOLE-BLAST).	38
9	Árbol filogenético de secuencia RS18 de <i>R. rickettsii</i> en garrapatas de caninos de Sinaloa comparado con secuencias del GenBank.	60
10	Árbol filogenético de secuencia RS8 de <i>R. rickettsii</i> en sangre de caninos de Sinaloa comparado con secuencias del GenBank.	61
11	Árbol filogenético de secuencia RS52 de <i>R. rickettsii</i> en sangre de caninos de Sinaloa comparado con secuencias del GenBank.	62

RESUMEN

Identificación genética de *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas de caninos domésticos del Estado de Sinaloa, México.

Mario César Rubio Robles

Rickettsia rickettsii, es el agente causal de la fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR), considerada dentro de las rickettsiosis como la enfermedad de mayor impacto para la salud pública, con desenlaces fatales desde un 20 a 80% cuando no es atendida de forma oportuna y adecuada. En Norteamérica se mantiene como la más letal enfermedad transmitida por artrópodos principalmente por garrapatas de los géneros *Dermacentor* (especies *andersoni*, *variabilis*, *occidentalis*, y *nitens*), *Amblyomma* (*cajennense*, *aureolatum*, *americanum*, *imitator*), *Haemaphysalis* (*leporispalustris*), y con mayor frecuencia por *Rhipicephalus sanguineus*; esta última puede parasitar al canino, y a su vez, estos actúan en el mantenimiento y transmisión tanto del vector como de esta enfermedad a otros hospederos incluidos los humanos; además *R. sanguineus* expuesta a altas temperaturas se une y alimenta de las personas con mayor rapidez, lo cual favorece el parasitismo humano por esta garrapata. En zonas con veranos cálidos, como el estado de Sinaloa, México, esta característica incrementa el riesgo de transmisión de *R. rickettsii*. El objetivo del presente trabajo fue identificar genéticamente *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas de caninos domésticos infestados naturalmente, atendidos en clínicas veterinarias de Sinaloa. Se obtuvieron muestras de sangre y garrapatas de 320 caninos, a las cuales se les extrajo ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo a la sangre y con el QIAamp DNA Mini Kit, a las garrapatas previa caracterización morfológica por claves dicotómicas. Mediante PCR se amplificaron fragmentos de los genes 16S *rRNA* y *gltA*, para identificar genéticamente *R. sanguineus* y *R. rickettsii* respectivamente. Morfológicamente se caracterizaron 642 (100%) garrapatas de las cuales se amplificaron, purificaron y secuenciaron 10 lotes con bandas de ~460 pb compatibles genéticamente con el gen 16S *rRNA* de *R. sanguineus*; la identificación genética de *R. rickettsii* se logró mediante amplificación, purificación y secuenciación de un segmento de ~401 pb del gen *gltA*, provenientes de 2 muestras de ADN sanguíneas y 1 de garrapatas; Con ello se evidenció la presencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en sangre y garrapatas de caninos domésticos de Sinaloa asociada a *R. sanguineus*, lo cual constituye mayor riesgo de diseminación y adquisición de esta enfermedad zoonótica. Palabras clave: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, Zoonosis, Caninos.

ABSTRACT

Genetic Identification of *Rickettsia rickettsii* in Blood and ticks of domestic canines of Sinaloa state, Mexico.

Mario Cesar Rubio Robles

Rickettsia rickettsii, is the causative agent of the Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF), considered within the rickettsial diseases as the disease with the greatest impact on public health, with fatal outcomes from 20 to 80% when are not intervened in a timely and suitable manner. In North America remains the deadliest disease transmitted by arthropods mainly gender tick *Dermacentor* (species *andersoni*, *variabilis*, *occidentalis*, and *nitens*), *Amblyomma* (*caiennense*, *aureolatum*, *americanum*, *imitator*), *Haemaphysalis* (*leporispalustris*), and most frequently by *Rhipicephalus sanguineus*; the latter can parasitize the canine and in turn, they act in the maintenance, and transmission of the vector and of this disease to other hosts including humans; *R. sanguineus* also exposed to high temperatures attach and feed on people faster, favoring the human parasitism by this tick. In areas with warm summers, such as the state of Sinaloa, Mexico, this feature increases the risk of *R. rickettsii* transmission. The aim of this study was the genetic identification of *Rickettsia rickettsii* in blood and ticks of naturally infected domestic canines treated at veterinary clinics in Sinaloa. DNA was extracted of Blood and ticks samples of the 320 canines, by phenol-chloroform technique to blood and with the QIAamp DNA Mini Kit to the ticks, prior morphological characterization by dichotomous keys. Genetical identification of *R. sanguineus* were by PCR with amplification of fragments the 16S *rRNA* gene, also were amplified fragments of the *gltA* gene for identification of *R. rickettsii*. Were characterized morphologically 642 (100%) *Rhipicephalus sanguineus* ticks, and after that were amplified, purified and sequenced, bands of 10 pools of ~460 bp genetically compatible with the 16S *rRNA* gene of *Rhipicephalus sanguineus*; the genetic identification of *Rickettsia rickettsii* was achieved by amplification, purification and sequencing of a ~401 bp segment of the *gltA* gene *Rickettsia rickettsii*, from 2 blood samples DNA and 1 of ticks; Thus is evident the *rickettsia* presence of the spotted fever group in blood and tick of domestic canines from Sinaloa, with *R. sanguineus* associated, this increased the dissemination risk and acquisition of this zoonotic disease.

Keywords: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, Zoonoses, Canine.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1. 1. INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis son una seria amenaza para la salud y el bienestar de las poblaciones a nivel mundial (OPS, 2004), debido a la interacción constante e inevitable del humano y de los animales de compañía, de granja y fauna silvestre, los cuales juegan un papel esencial en el mantenimiento, distribución y transmisión de agentes infecciosos (WHO, 2006), como bacterias, virus, parásitos y hongos de numerosos géneros y especies, quienes ocasionan una gran variedad de enfermedades que afectan amplios sectores de la población (Dabanch, 2003; Buitrago y Pachón, 2008). A causa de la dificultad en el diagnóstico de las rickettsiosis, se presentan desenlaces fatales cuando no son intervenidas de forma oportuna y adecuada (Buitrago y Pachón, 2008), con tasas de letalidad desde un 20 a 80% de los casos (SINAVE, 2014); representan un desafío para la salud pública Mexicana dado su carácter de enfermedades emergentes las cuales además de ser poco conocidas en nuestro medio, frecuentemente generan signos clínicos asociados a otras enfermedades febriles como son dengue, leptospirosis, fiebre tifoidea, ehrlichiosis, meningococemia o infección por enterovirus; en México se ha reportado que alrededor del 25.5% de los cuadros diagnosticados como dengue, en realidad eran positivos a rickettsiosis (Heymann, 2005; SINAVE, 2010).

Dentro de las rickettsiosis, la fiebre manchada, la cual en América es conocida como fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR) o fiebre manchada brasileña, es la enfermedad más grave a nivel mundial, y es ocasionada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*, transmitida por garrapatas como *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*, *D. occidentalis*, *D. nitens*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma*

cajennense, *A. aureolatum*, *A. americanum*, *A. imitator*, *Haemaphysalis leporispalustris* (Parola *et al.*, 2013). Estas especies de garrapatas infectadas pueden parasitar al canino y estos a su vez, actúan como reservorios en la transmisión de esta enfermedad a otros hospederos incluidos los humanos (Cunha *et.al.*, 2009). La prevalencia de *R. rickettsii* en caninos domésticos varía entre 3% en Arizona, USA (Demma *et al.*, 2005) hasta 31.25% en Mexicali B.C., México (Eremeeva *et al.*, 2011).

En México se ha asociado la transmisión de *R. rickettsii* por garrapatas *A. cajennense*, *A. imitator* y principalmente con *R. sanguineus* (Oliveira, 2010; Gómez *et al.*, 2013); esta última además de sus características endofílicas, perfectamente adaptada al ambiente doméstico, expuesta a altas temperaturas, se une y alimenta de los seres humanos con mayor rapidez, lo cual aunado a la estrecha relación de convivencia entre humanos y caninos (Parola *et al.*, 2008), así como al ambiente adecuado para el desarrollo de estos vectores, incrementa la posibilidad de que estos puedan ser atacados por garrapatas infectadas (Cunha *et.al.*, 2009). Todo esto genera las condiciones propicias para la presentación de esta enfermedad en zonas cálidas como el estado de Sinaloa, México, con un alto riesgo para la salud pública. Por lo anterior expuesto, el objetivo de este trabajo fue identificar genéticamente *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas de caninos domésticos infestados naturalmente, atendidos en clínicas veterinarias de Sinaloa.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1. Generalidades de rickettsiosis

Las rickettsiosis son un grupo de enfermedades zoonóticas que incluyen tifus epidémico, tifus murino, fiebre manchada de las Montañas Rocosas y fiebre manchada del Mediterráneo (Merhej y Raoult, 2011), las cuales son causadas por bacterias del género *Rickettsia*, pequeños microorganismos aerobios e intracelulares obligados con aspecto de bacilos cortos, Gram negativos (0,3-0,5 x 0,8-2 μm) con similitudes entre sí, desde el punto de vista clínico (Quintero *et al.*, 2012; InDRE, 2015). Frecuentemente son transmitidas por garrapatas, piojos, pulgas, ácaros y arácnidos, los cuales pueden utilizar hospederos primarios como los gatos, perros, ratas e incluso ardillas; estos hospederos vertebrados e invertebrados (artrópodos), pueden cumplir el papel de vector y/o reservorios primarios para estos microorganismos y entrar en contacto con los humanos (Olano, 2005; Field-Cortazares y Seijo Moreno, 2011; Faccini-Martinez *et al.*, 2014).

El modo de infección es por picadura o por contaminación de heridas abiertas y escoriaciones localizadas en la piel o en las mucosas en contacto directo con los tejidos o fluidos de los vectores aplastados, no existe transmisión directa de persona a persona (SINAVE, 2012; InDRE, 2015). Los blancos primarios de infección en hospederos mamíferos son las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos, también pueden infectar varios tipos de células incluyendo las de músculo liso vascular y macrófagos, multiplicándose por fisión binaria en el citosol y ocasionalmente en el núcleo de las células infectadas en un periodo de 8 a 10 h (InDRE, 2015). En hospederos artrópodos se multiplican en la mayoría de los órganos y los fluidos, particularmente en las glándulas salivales y los ovarios, lo que permite la transmisión horizontal durante la alimentación y la transmisión de adulto a su descendencia (transmisión transovárica vertical). La mayoría de las rickettsias parecen no tener ningún efecto perjudicial sobre los artrópodos (Merhej y Raoult, 2011).

1.2.1.1. Taxonomía y Filogenia. Los aportes de diferentes técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Polimorfismos de Longitud de

Fragmentos de Restricción (RFLP) y secuenciación de ácidos nucleicos, han mejorado el entendimiento de las relaciones filogenéticas y la posición taxonómica de las diversas especies, dando lugar a que el término "*rickettsia*" se aplique únicamente a bacterias del género *Rickettsia*, pertenecientes a la familia *Rickettsiaceae*, al orden Rickettsiales y a la clase Alphaproteobacteria (Fournier y Raoult, 2005; Quintero *et al.*, 2012).

En los estudios taxonómicos y filogenéticos de *Rickettsia*, el primer gen usado fue el 16S *rRNA* con el que se han identificado secuencias específicas para cada serotipo de *Rickettsia* logrando confirmar la unidad evolutiva del género, aunque también se observan altos niveles de similitud entre éstas (99,9%) que dificultan las inferencias de filogenia dentro del mismo (Ogrzewalska *et al.*, 2012). Su uso generó un gran avance en la clasificación de este género permitiendo establecer el Grupo de las Fiebres Manchadas (GFM) donde se agrupan la mayoría de especies, y el grupo Tifo (GT); por otro lado, se evidenció la separación de las especies *R. canadensis* y *R. bellii* que los agrupa en el denominado Grupo Ancestral (GA) (Ogrzewalska *et al.*, 2012; Stothard y Fuerst, 1995). También dio lugar a la reclasificación de géneros de bacterias ubicados en el orden Rickettsiales como *Coxiella*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Bartonella*, *Rochalimaea* y *Grahamella*, así como en otros órdenes, familias e incluso clases. Con ello, la antigua bacteria *Rickettsia tsutsugamushi*, agente etiológico del denominado "Tifo de los Matorrales" (Scrub-Typhus), pudo ser diferenciada lo suficiente como para ser reclasificada dentro de un nuevo género: *Orientia* con una única especie *Orientia tsutsugamushi* (Fournier y Raoult, 2009; Eremeeva, 2012). Otros estudios genómicos de la especie *R. felis*, han propuesto la conformación adicional de un Grupo Transicional (GTR) donde se incluirían las especies *R. felis* y *R. akari*, las cuales comparten características biológicas con los grupos GFM y GA (Gillespie *et al.*, 2007).

Debido a las limitaciones del gen 16S *rRNA* para hacer una diferenciación dentro del género, comenzaron a usarse otros genes entre los que se incluyen, el gen que codifica las proteínas citrato sintasa (*gltA*, presente en todas las rickettsias), los genes que codifican las proteínas de superficie *OmpA* (presente en todas las especies de rickettsias del GFM) y *rOmpB* (presente en todas las rickettsias, excepto

R. bellii); existen otras dianas como el gen *htrA* que codifica una proteína antigénica de 17kDa, los genes *sca4*, *sca1*, *sca2*, *atpA* y *coxA* (Oteo *et al.*, 2014; Santibáñez, 2014; Fournier y Raoult, 2009; Weinert *et al.*, 2009), que han generado diversas clasificaciones como la propuesta por Weinert *et al.*, (2009) (Figura 1).

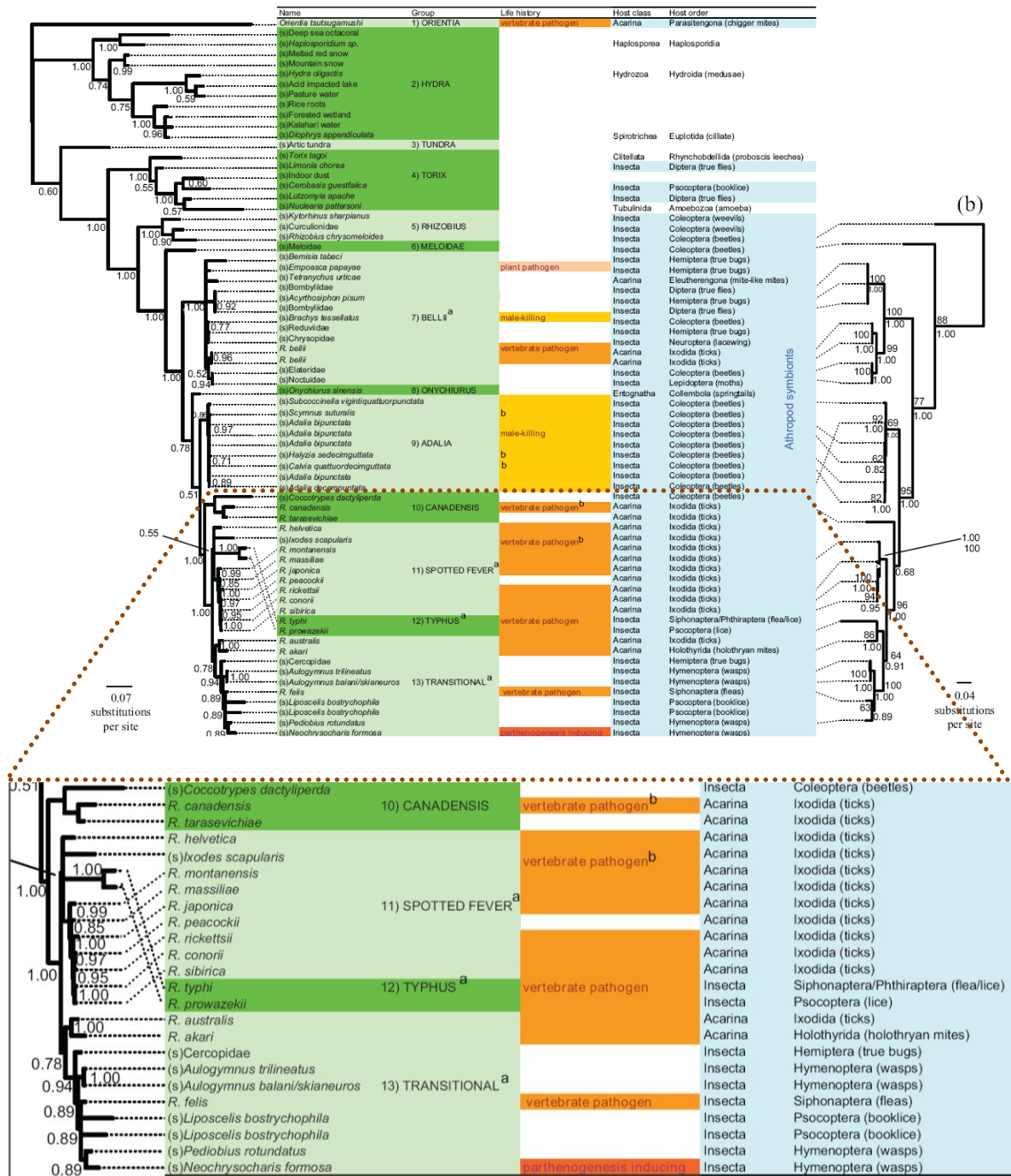


Figura 1. Filogenia de *Rickettsia* spp. utilizando secuencias de los genes *atpA*, *CoxA*, *gltA* y 16S *rRNA* asociada con vectores artrópodos (Weinert *et al.*, 2009).

A pesar de los diversos intentos de clasificación, la definición de una especie dentro del género *Rickettsia* ha sido motivo de diversos debates debido a la falta de normas oficiales, dando lugar a que diversas características genotípicas, fenotípicas y filogenéticas se usen para la definición de una especie (Fournier y Raulot, 2009); actualmente son aceptadas dos clasificaciones para el género *Rickettsia* ambos con cuatro grandes grupos.

La primera clasificación contempla los siguientes grupos:

- a) **Grupo Tifo** (*R. prowazekii* y *R. typhi*, ambas patógenas para los seres humanos (Gillespie *et al.*, 2008).

- b) **Grupo de las Fiebres Manchadas de las Montañas Rocosas (FMRR)**, contempla 20 especies, todas patógenas para el humano, de las cuales *R. rickettsii*, es considerada la más virulenta (Parola *et al.*, 2005), también conformado por: *R. conorii subsp. conorii* (fiebre manchada mediterránea), *R. conorii subsp. israelensis* (fiebre manchada israelí), *R. conorii subsp. caspia* (fiebre Astrakán), *R. conorii subsp. indica* (tifo por garrapata de la India), *R. sibirica subsp. sibirica* (tifo por garrapata siberiana o tifo por garrapata norasiática), *R. sibirica subsp. mongolitimonae*, *R. australis* (tifo por garrapata Queensland), *R. japonica* (fiebre manchada japonesa u, oriental), *R. africae* (fiebre por mordedura de garrapata africana), *R. honei* (fiebre manchada de la isla Flinders), *R. slovacae*, *R. parkeri*, *R. aeschlimannii*, *R. amblyommii*, *R. massiliae*, *R. heilongjiangensis*, *R. marmionii*, *R. texiana* y *R. helvetica* (Quintero *et al.*, 2012; Sahni *et al.* 2013).

- c) **Grupo Transicional**, constituido por *R. akari* y *R. felis* (Gillespie *et al.*, 2008).

- d) **Grupo Ancestral**, formado por *R. belli* y *R. canadensis* (Gillespie *et al.*, 2008).

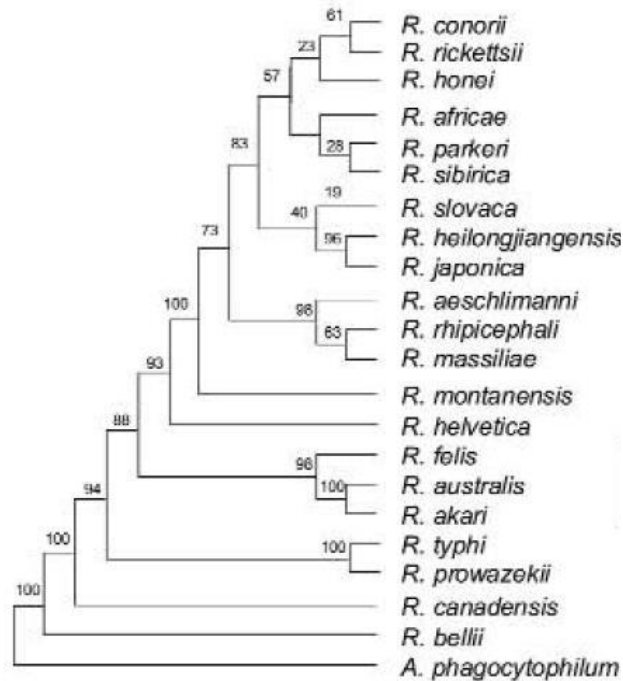


Figura 2. Filogenia de especies de *Rickettsia* basada en la comparación de secuencias del gen *gltA*. (Fournier y Raoult, 2005).

Además considerando los análisis filogenéticos del gen *gltA* se diferencian cuatro conglomerados de especies dentro del grupo de las fiebres manchadas (**Figura 2**). Similar a lo hallado con el gen *16S rRNA*, donde las especies *R. canadensis* y *R. bellii* forman un conglomerado aparte del grupo GFM y GT en una ramificación evidente (Fournier y Raoult, 2009; Roux y Raoult, 2000).

1. *R. rickettsii* incluye las especies: *R. conorii*, *R. honei*, *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. heilongjiangensis* y *R. japonica*
- 2.- *R. massiliae* que incluye *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. montanensis*, *R. aeschlimannii*
3. *R. akari* contempla las especies *R. akari*, *R. felis*, y *R. australis*
4. *R. helvetica* agrupa a *R. helvetica*, *R. asiatica* y *R. tamurae*.

Con lo anterior se diferencian integrantes de este grupo y concuerdan con Merhej *et al.* (2014) quien postula la segunda propuesta de clasificación (**Figura 3**), obtenida de un árbol consenso construido con base en las secuencias de las proteínas de membrana externa y la citrato sintasa, contempla cuatro grupos, y a su vez describe subgrupos:

1) Grupo de las Fiebres Manchadas (GFM)

subgrupo *R. rickettsii* (17 especies: *R. rickettsii* str. Sheila Smith, *R. rickettsii* str. Iowa, *R. rickettsii* str. Hlp2, *R. philipii*, *R. peacockii*, *R. montanensis*, *R. sibirica*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. conorii*, *R. slovacae*, *R. honei*, *R. heilongjiangensis*, *R. japonica*, y candidato *R. amblyomii*).

subgrupo *R. massiliae* (5 especies: *R. massiliae* MTU5, *R. massiliae* AZT80, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimannii* y *R. raoultii*).

subgrupo *R. helvetica* (5 especies: *R. helvetica*, *R. asiatica* y *R. tamurae*, *R. endosymbiont de Ixodes scapularis* y *R. monacensis*).

subgrupo *R. akari* (4 especies: *R. akari*, *R. felis*, *R. australis* y *R. hoogstralii*).

2) Grupo tifo:

subgrupo *R. prowazekii* (*R. prowazekii* str. MadridE, *R. prowazekii* str. BuV67CWPP, *R. prowazekii* str. Chernikova, *R. typhi* str. TH1527, *R. typhi* str. Wilmington, *R. typhi* str. B9991CWPP).

3) grupo ***R. canadensis*** (2 especies: *R. canadensis* str.CA410 y *R. canadensis* str.McKiel).

4) grupo ***R. bellii*** (2 especies: *R. bellii* OSU 85389 y *R. bellii* RML369C)

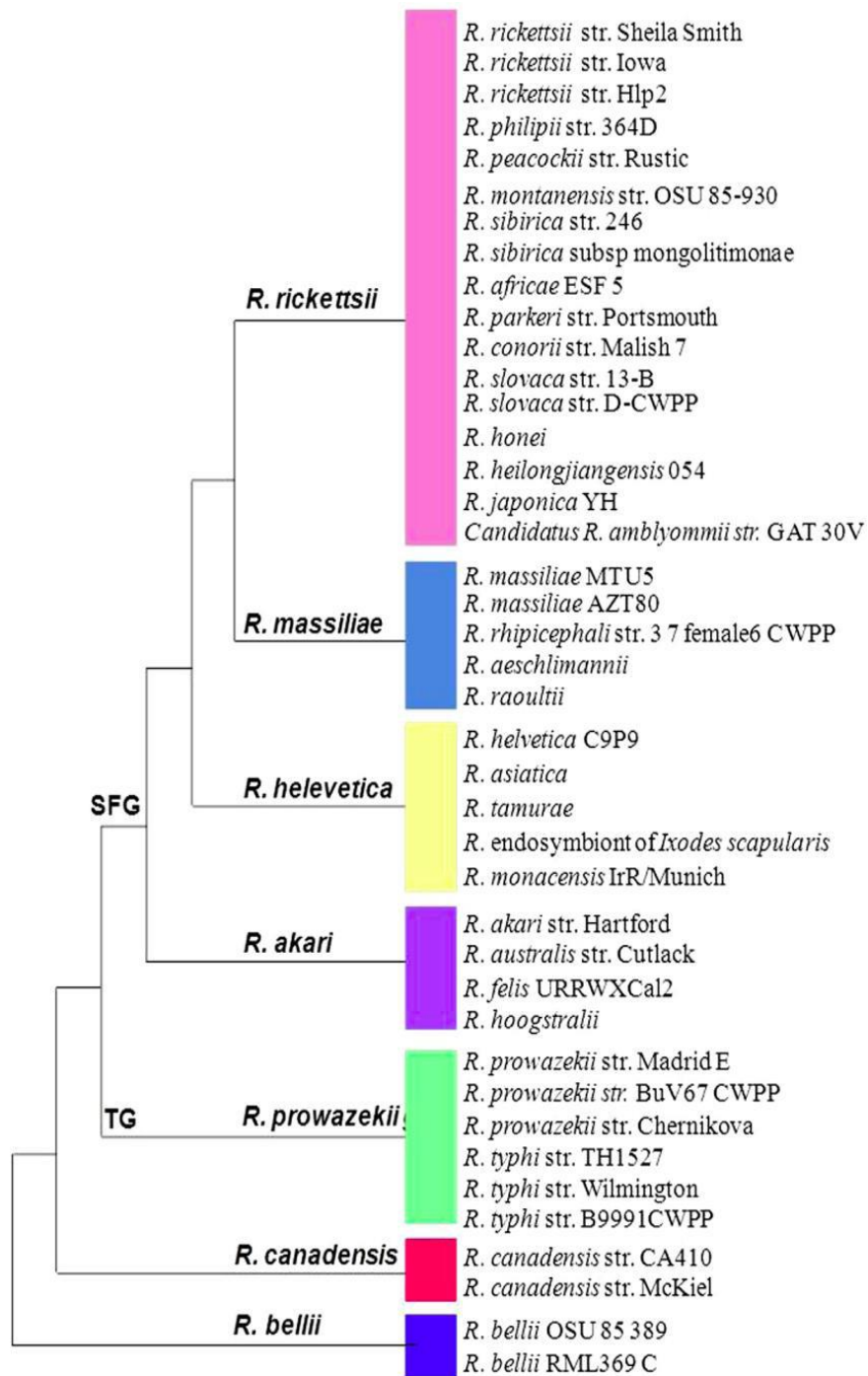


Figura 3: Árbol filogenético de todas las especie reconocidas de *Rickettsia*, obtenido de un árbol consenso construido con base a las secuencias de las proteínas de membrana externa y la citrato sintasa (Merhej *et al.*, 2014).

Los distintos géneros y especies de la familia *Rickettsiaceae* mantienen ciclos zoonóticos en la naturaleza, representando una amenaza a la población (Field-Cortazares y Seijo-Moreno 2011) y constituyen un grave problema sanitario de gran impacto a nivel mundial (OPS, 2004) (**Figura 4**).

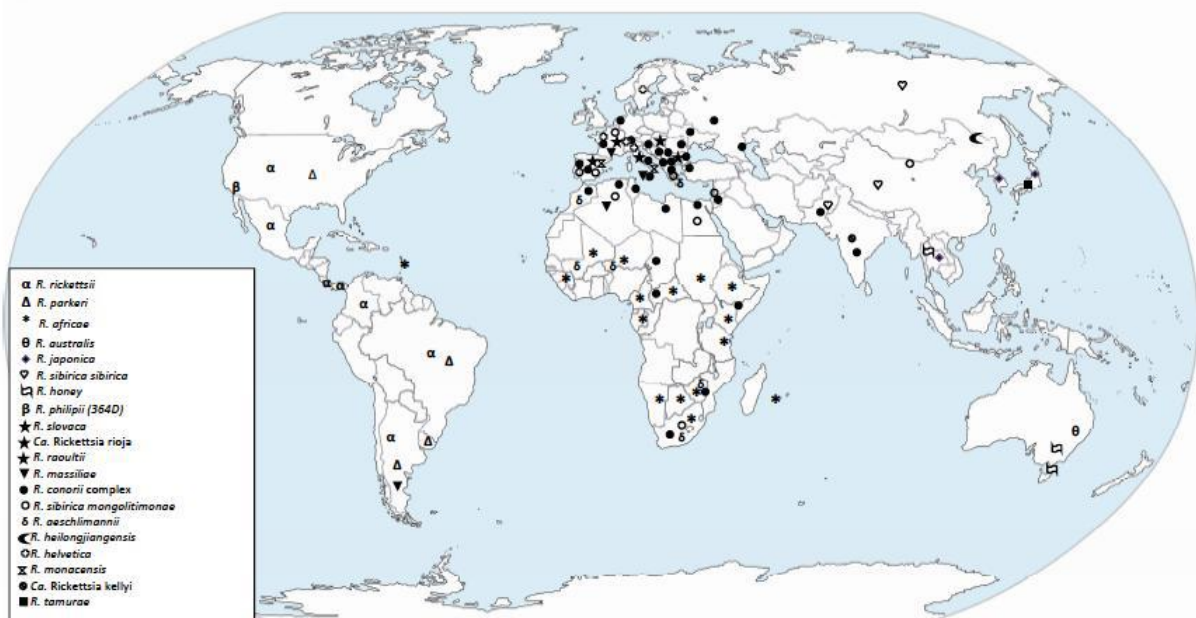


Figura 4. Distribución geográfica de las principales especies de *Rickettsia* patógenas transmitidas por garrapatas de los géneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor* y *Amblyomma* (Faccini-Martínez *et al.*, 2014).

México es un territorio con las condiciones geográficas, demográficas y socioeconómicas, así como de marginación y pobreza favorables para la transmisión de rickettsiosis (InDRE, 2015). Las rickettsias de mayor importancia epidemiológica en México son las siguientes:

- ***Rickettsia rickettsii***: agente etiológico de la FMMR, transmitida principalmente por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, de la cual su principal reservorio es el perro (InDRE, 2015), es la de mayor morbilidad en el país al notificarse 2,616 casos en el periodo 2009-2011 (SINAVE, 2012) y 1032 casos solamente en 2013 (SINAVE, 2015b).
- ***Rickettsia typhi***: causante del tifus murino o endémico, los roedores son su principal reservorio y los principales vectores son las pulgas de rata y gato

(InDRE, 2015), constituye la segunda *rickettsiosis* en importancia en el país y de la cual se reportaron 203 casos de 2001 a 2011 (SINAVE, 2012).

- ***Rickettsia prowasekii***: agente del tifus epidémico, su vector principal es el piojo de cuerpo humano, la gente infectada puede presentar una reincidencia conocida como enfermedad de Brill-Zinsser donde las personas reincidentes pueden generar nuevos brotes y de la cual se desconocen las causas (InDRE, 2015); en el periodo 2006-2011 solo se notificaron trece casos: 10 en 2006, 2 en 2010 y uno en 2011 (SINAVE, 2012).

Los principales grupos de alto riesgo son personas que habitan en hacinamiento, con pobres medidas de higiene, y cohabitan con roedores o con animales infectados (SINAVE, 2014).

1.2.2. FMMR por *Rickettsia rickettsii*

Es una enfermedad prototipo de las fiebres maculosas causada por rickettsias, también conocida como fiebre maculosa de las montañas rocosas, tifus norteamericano transmitido por garrapatas, fiebre maculosa del nuevo mundo, tifus transmitido por garrapatas (Heymann, 2005), tifus maculoso, fiebre petequial Colombiana, tifus de Sao Paulo, fiebre maculosa Brasileña (Buitrago y Pachón 2008); en México también se le conoce como fiebre manchada y fiebre de Choix (Bustamante y Varela, 1944).

Los primeros antecedentes documentados de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), en Norte América datan de 1899 (Telford, 2004), aunque los primeros en investigar su etiología, fueron los patólogos Wilson y Chowning en 1902 (Wilson *et al.*, 1904). En 1906, estudios realizados por Howard Ricketts, demostraron que la FMMR era transmitida a través de sangre infectada, y que el vector de esta enfermedad eran las garrapatas de la especie *Dermacentor andersoni* la cual transmitía la bacteria a través de su progenie (transmisión transovárica) (Quintero *et al.*, 2012; Ricketts, 1909). Posteriormente, en América del Norte (Estados Unidos), América Central y Sur América (Brasil), los médicos

comenzaron a identificar casos de FMMR transmitida por garrapatas. La descripción clínica de la enfermedad se realizó en 1925 y desde 1930 en Brasil, se ha documentado la enfermedad denominada: “Tifus exantémico de Sao Pablo”, “Tifus exantémico de Minas Gerais” y finalmente “Fiebre manchada del Brasil” cuya etiología ha sido *Rickettsia rickettsii*. Para 1931, la enfermedad estaba generalizada en Norte América y en los siguientes años la FMMR se confirmó en Colombia, México, Canadá, Panamá, Costa Rica y Argentina, esto indicó que se trataba de una enfermedad emergente y re-emergente en diferentes partes del mundo (Quintero *et al.*, 2012; Raoult y Parola, 2008).

Los caninos y felinos son los animales domésticos donde más se han estudiado las rickettsias; en Brasil se llevó a cabo un hallazgo de laboratorio en caninos infectados con *R. rickettsii* con prevalencia de 4 a 31% y otros estudios desarrollados en Estados Unidos, han mostrado la diseminación de esta bacteria en 5 a 15% de los caninos de ese país (Piranda *et al.*, 2008; Scorpio *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2007). En otros países de Sur América, se muestra también la importancia de la infección en caninos y otros animales domésticos. Un reporte de 2007 en regiones urbanas de Santiago en Chile, evidenció dos casos clínicos de caninos que presentaron signos clínicos de la enfermedad (López *et al.*, 2007). En Colombia, en muestras de sangre de caninos y equinos, se encontró una reactividad alta para rickettsias de las fiebres manchadas, mediante IFI, lo que permitió proponer que estos animales podrían servir como centinelas de la rickettsiosis (Hidalgo *et al.*, 2009).

1.2.2.1. Impacto en Salud Pública. La FMMR es considerada dentro de las *rickettsiosis* como la enfermedad de mayor impacto para la salud pública (SINAVE 2010), al ser una de las infecciones más virulentas identificadas en los seres humanos, y su diagnóstico a menudo representa un dilema para los médicos (Dantas-Torres, 2007). Se comporta como la mayor fiebre manchada rickettsial del hemisferio occidental (Houhamdi y Raoult, 2006), potencialmente mortal, incluso en personas jóvenes sanas (Dantas-Torres, 2007), se mantiene como la enfermedad más letal transmitida por artrópodos en Norteamérica (Elston, 2005) con índice de mortalidad hasta del 30% en pacientes no tratados e incluso con tratamiento, las

proporciones de hospitalización son cercanas al 72% (CDC, 2003), alcanzando el 5% de mortalidad en casos tratados (Dantas-Torres, 2007).

En el continente Americano presenta diferentes comportamientos epidemiológicos (Gómez *et al.*, 2013) con variabilidad estacional, la cual va de la mano con la actividad de sus vectores, las garrapatas (Elston, 2005). Se ha notificado la infección de *R. rickettsii* en Argentina, Brasil, Canadá, Colombia, Costa Rica, Panamá, México y Estados Unidos (Heymann, 2005). Los países que más reportan la enfermedad son Estados Unidos y Brasil, en ambos existe un sistema de reporte obligatorio de casos y fuertes sistemas nacionales de vigilancia epidemiológica. En los Estados Unidos a partir de 1970 se registraron los primeros informes epidemiológicos detallados de casos clínicos (Childs y Paddock, 2002; Paddock *et al.*, 2002a), entre 1983 y 1998, fueron reportadas 612 muertes y se estima que en el mismo período, hubo un subregistro de 400 casos adicionales (Paddock *et al.*, 2002b), alcanzando hasta 2002 una incidencias entre 1,5 y 5,0 casos/millón de habitantes (Childs y Paddock, 2002). Entre el año 2000 y 2007 fueron reportados 11.531 casos de los cuales se confirmaron 2.258, con un rango que osciló entre 490 y 2.133 casos anuales, y alcanzó niveles históricos de hasta 7 casos/millón de hab., aparentemente por una mayor disponibilidad de los estuches diagnósticos de ELISA (Openshaw, *et al.*, 2010). En Brasil, solo en el Estado de São Paulo fueron confirmados 440 casos entre los años 1985 y 2011 y en el periodo 1997-2010, se registraron 868 casos con una letalidad que alcanzó el 29.1% con un total de 227 muertes en 9 estados con vigilancia epidemiológica activa, siendo un indicador de alto impacto en salud pública. (Dantas-Torres, 2007; Labruna *et al.*, 2009; Pinter *et al.*, 2011).

En México, Bustamante y Varela (1944), registraron 150 casos y 93 defunciones por FMMR en humanos en el sur de Sonora y norte de Sinaloa, principalmente en los municipios de Choix y el Fuerte. Después de ese registro no se encuentran publicaciones posteriores, sino hasta 2004 cuando se notifica una muerte en Yucatán (Zavala-Castro *et al.*, 2006), en 2006 en Nuevo León 26 casos positivos (Mercado, 2010), en Mexicali (Baja California Norte) de 2008-2009 se cuantificaron 1453 casos sospechosos, 278 positivos, 13 defunciones sospechosas y ocho confirmadas (Field Cortazarez y Seijo-y-Moreno, 2011). En Sonora, durante el periodo 2008-2013 se

registraron aproximadamente 100 casos del padecimiento cada año, y la letalidad en la población general oscila entre 8 y 17.8%. En el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) desde el año 2004 se han registrado 121 casos de FMRR y 35 de esos niños han fallecido, con una letalidad anual que fluctúa entre 0 y 63%, y una tendencia ascendente (Álvarez-Hernández y Contreras, 2013); en Coahuila durante 2012 se confirmaron 29 casos incluidas 3 defunciones (SINAVE, 2012). En 2013 fueron reportados a nivel nacional 1032 casos mayormente en los estados de Aguascalientes (559), Coahuila (193), Sonora (81), Michoacán (68), Baja California Sur (54), Nuevo León (28) y Sinaloa (23) (SINAVE, 2015a). En 2014 se contabilizaron 269 casos de los cuales 88 se presentaron en Coahuila, 64 en Sonora, 41 en Baja California Norte, 33 en Baja California Sur, 21 en Nuevo León y 10 en Sinaloa, aunque también se reportan 948 casos de otras Rickettsiosis (CIE-10 REV. A75.9), de las cuales 524 (55.27%) se presentaron en Sinaloa (SINAVE 2015b). La mayoría de los casos letales se encuentran especialmente asociados a un mal diagnóstico de la enfermedad y a la consiguiente falta o retraso en la aplicación de un tratamiento específico (Álvarez-Hernández, 2010).

1.2.2.2. Ciclo biológico. En el ciclo biológico de *R. rickettsii*, cuyo periodo de incubación es de 3 a 14 días, se involucran hospederos vertebrados e invertebrados. De manera intracelular las rickettsias suelen reproducirse por fisión binaria dentro de las células endoteliales que revisten los pequeños vasos sanguíneos; generalmente resultan afectados los ubicados en la piel y debajo de ésta, así como los del cerebro, pulmones, corazón, riñones, hígado y bazo (Merck Sharp y Dohme, 2015; SINAVE, 2014). El proceso de internación celular se inicia mediante fagocitosis; dentro del citoplasma, las rickettsias escapan al fagosoma y también pueden invadir el núcleo, la consecuencia final del paso intercelular a través de las células endoteliales lleva a la disrupción y daño endotelial directo, dichos vasos se inflaman (vasculitis) o se obstruyen alterando la homeostasis del endotelio causando permeabilidad con diseminación de la sangre dentro de los tejidos que los rodean, generando así petequias, erupciones o maculas y vasodilatación (Merck Sharp y Dohme, 2015; Sahni *et al.*, 2013; Walker y Ismail, 2008).

1.2.2.3. Transmisión. *R. rickettsii* se transmite por la picadura de una garrapata infectada, la cual actúa como reservorio y vector del patógeno; cuando la garrapata se adhiere y alimenta de un hospedero, se lleva a cabo un fenómeno de reactivación y *R. rickettsii* se transforma de un estado inactivo avirulento a uno altamente patógeno; este proceso requiere un período mínimo de unión de 4 a 6 h, aunque puede ser tan largo como 24 h (Dantas-Torres, 2007), también existe la posibilidad de adquirir la infección por el contacto con los tejidos o fluidos de garrapatas aplastadas, por la contaminación de excoriaciones en la piel o en las mucosas (Heymann, 2005), por inhalación de aerosoles contaminados (reportado sólo en laboratorios), y a través de transfusión sanguínea; por lo que se sugiere especial cuidado al quitar las garrapatas para evitar el contacto con los elementos mencionados (Dantas-Torres, 2007).

R. rickettsii también se puede encontrar en mamíferos domésticos y salvajes, sin embargo, el papel de estos animales como reservorios de la infección no se entiende bien; algunos de estos animales pueden servir como reservorios secundarios u hospederos amplificadores (Dantas-Torres, 2007).

En la naturaleza, *R. rickettsii* se perpetúa por el paso transovárico y transestadial en garrapatas tales como *Dermacentor variabilis* (garrapata americana del perro), *Dermacentor andersoni* (garrapata de la madera de las Montañas Rocosas), *Dermacentor occidentalis*, *Dermacentor nitens*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma americanum*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma imitator* y *Rhipicephalus sanguineus* (garrapata café del canino) (Parola *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2010; Holman *et al.*, 2009; Heymann, 2005).

1.2.2.3.1. Generalidades de garrapatas. Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de los animales salvajes, domésticos y de los seres humanos; se clasifican en la subclase Acari, orden Parasitiformes, suborden Ixodida y están distribuidos desde el Ártico a las regiones tropicales del mundo (Estrada-Peña *et al.*, 2012), con mayor prevalencia en las regiones tropicales y subtropicales (Gray *et al.*, 2013); se estima la existencia de aproximadamente 900 especies,

encontradas prácticamente en todos los ecosistemas (Socolovschi *et al.*, 2009). Como parásitos, las garrapatas poseen potencial para provocar toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores (Debárbora *et al.*, 2011), y además pueden actuar en el mantenimiento y transmisión de muchos microorganismos patógenos como bacterias, helmintos, protozoos y virus que afectan a los animales domésticos y al humano (Dantas-Torres, 2010).

Las garrapatas son consideradas a nivel mundial después de los mosquitos, como los segundos vectores transmisores de patógenos responsables de más de 100.000 casos de enfermedad en humanos en todo el mundo; pero son los vectores más importantes de transmisión de agentes patógenos causantes de enfermedades en animales domésticos (De la Fuente *et al.*, 2008); situación generada principalmente por la dinámica poblacional con variación espacial y temporal de las garrapatas, asociada a la gran movilidad de la población humana y sus animales de compañía, combinado con los cambios en los ecosistemas favorables para la sobrevivencia de los ectoparásitos y la facilidad de estos artrópodos para adaptarse a las diferentes condiciones climatológicas (Dantas-Torres, 2010).

A nivel mundial se reportan prevalencias de garrapatas en caninos como las registradas en Brasil desde 27 a 67% (Szabo *et al.*, 2001; Buitrago y Pachón, 2008), en Estados Unidos van de 57 a 78% (Demma *et al.*, 2005), en Japón 4.8% (Shimada *et al.*, 2003), Israel de 16 a 34% (Mumcuoglu *et al.*, 1993), Italia 9.7% (Tringali *et al.*, 1986) y en Nigeria 19.5% (Ugochukwu y Nnadozie, 1985). En México se reporta en la ciudad de Mexicali, Baja California Norte, una prevalencia de 65.1% (Tinoco-Gracia *et al.*, 2009b), en Cuernavaca, Morelos 20% (Cruz *et al.*, 1998) y en Culiacán, Sinaloa 46% (Gaxiola *et al.*, 1997).

En México se ha asociado la transmisión de *R. rickettsii* por garrapatas *A. cajennense*, *A. imitator* (Oliveira, 2010) y principalmente por *R. sanguineus* (Gómez *et al.*, 2013); esta última con un creciente número de casos de parasitismo humano que refleja la existencia de una interacción más común de lo reconocido en realidad entre el humano y la garrapata *R. sanguineus* (Cunha *et al.*, 2009).

1.2.2.4. Signos clínicos de FMMR. Los hospederos afectados pueden ser desde asintomáticos hasta presentar enfermedad severa potencialmente fatal, con una amplia gama de signos clínicos; los casos leves o asintomáticos rara vez son diagnosticados (Yabsley *et al.*, 2013), incluso los sintomáticos pueden alcanzar una elevada tasa de letalidad cuando no se diagnostican adecuada y oportunamente (SINAVE, 2014).

Las infecciones en los animales suelen ser subclínicas, pero se ha observado enfermedad manifiesta en los roedores y en los caninos (Heymann, 2005). Los caninos susceptibles a *R. rickettsii* pueden desarrollar una enfermedad grave con rapidez, aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas o leves (Yabsley *et al.*, 2013), pueden desarrollar signos como fiebre, letargia, vómito y anorexia y a medida que la enfermedad progresa, otros signos como lesiones oculares, alteraciones en la coagulación (trombocitopenia), artralgias, orquitis y signos neurológicos pueden ser observados (Obert *et al.*, 2004; Mikszewski y Vite, 2005; Nicholson *et al.*, 2010).

En humanos las manifestaciones clínicas de la enfermedad son inespecíficas y después del período de incubación promedio de 7 días (2-14 días) los signos clínicos iniciales son similares a los de otras enfermedades asociadas a garrapatas así como a otras entidades virales y bacterianas con las que también puede confundirse tales como dengue, hantaviriosis y leptospirosis, ehrlichiosis, meningococemia o infección por enterovirus entre otras (Silbert, 1996; Heymann, 2005; Parola *et al.*, 2005; Dantas-Torres, 2007). Las manifestaciones pueden ser sistémicas, cutáneas, cardíacas, pulmonares, gastrointestinales, renales, oculares y musculoesqueléticas, y presentar hepatoesplenomegalia, hemorragias, y complicaciones neurológicas (Silbert, 1996; SINAVE, 2014).

Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad son fiebre moderada o alta de comienzo repentino, malestar general, cefalea intensa, escalofríos y mialgias (SINAVE, 2014); también se puede presentar dolor muscular profundo, hiperemia conjuntival, dolor abdominal focal o generalizado, náuseas, vómito, anorexia y diarrea. Entre el tercero y quinto día, suele aparecer una erupción maculopapulosa en las extremidades, la cual inicia con máculas pequeñas, irregulares y rosadas que

se localizan típicamente en muñecas, tobillos y antebrazos y pronto abarca las palmas de las manos y las plantas de los pies, propagándose rápidamente a gran parte del cuerpo. Posteriormente, la erupción puede evolucionar a pápulas o petequias y en casos severos, el daño tisular continuo, puede producir necrosis en piel y gangrena (Helmick *et al.*, 1984; Thorner, 1998; Sexton y Kaye, 2002; Heymann, 2005; Parola *et al.*, 2005).

En 40 a 60% de los enfermos se presenta un exantema petequial, por lo regular al sexto día o poco después. La erupción normalmente se observa al inicio de la enfermedad, aunque en aproximadamente un 10% de los pacientes puede estar ausente, dificultando aún más el diagnóstico y tratamiento oportuno (Sexton y Kaye, 2002; Heymann, 2005).

Otras manifestaciones clínicas son miocarditis, de presentación poco común; hepatomegalia; manifestaciones respiratorias como tos y neumonía; falla renal aguda (común en casos severos); signos musculoesqueléticos; algunas manifestaciones neurológicas como letargia, fotofobia, amnesia, cambios comportamentales, sordera transitoria; y signos oculares como conjuntivitis, oclusión arterial, engrosamiento de la vena retiniana y hemorragia en retina (Helmick *et al.*, 1984; Dantas-Torres, 2007).

La tasa de letalidad sin el tratamiento específico es de 13 a 25%; con el diagnóstico y el tratamiento oportunos, los enfermos rara vez mueren, aunque de 3 a 5% de los casos notificados en Estados Unidos han sido mortales; entre los factores de riesgo relacionados con una afección más grave y con la muerte destacan el retraso del inicio de la antibióticoterapia y pacientes mayores de 40 años de edad. La ausencia de la erupción típica, su aparición tardía o el hecho de que no se reconozca, en particular en personas de piel oscura, contribuyen al retraso en el diagnóstico y a una mayor letalidad (Heymann, 2005).

1.2.2.5. Diagnóstico de FMMR. Debido a que la presentación clínica de las rickettsiosis del grupo de fiebres manchadas, es poco específica, puede llevar a confusión en el diagnóstico diferencial con otras infecciones existentes en áreas endémicas como dengue, leptospirosis, influenza, fiebre tifoidea y bartonelosis (Anaya *et al.*, 2008), hecho por el cual el diagnóstico específico de esta enfermedad

es de gran importancia tanto para los humanos como para los caninos (Chomel, 2011). Sin embargo este representa un desafío importante, porque los signos clínicos inducidos por diversos agentes patógenos transmitidos por vectores pueden ser similares y además presentarse coinfecciones con dos o más agentes ocasionando la superposición de signos clínicos atípicos (Mekuzas *et al.*, 2009; Sasanelli *et al.*, 2009); por tanto, el diagnóstico depende de la sospecha clínica y epidemiológica con la confirmación por el laboratorio (Morón *et al.*, 2001; Anaya *et al.*, 2008). El reconocimiento oportuno puede contribuir favorablemente en la respuesta terapéutica y la sospecha clínica temprana puede ayudar a diferenciarla de otros padecimientos. Desde el punto de vista de salud pública, la identificación de casos de FMMR puede apoyar considerablemente en las tareas de control del vector, priorización de áreas de riesgo, y vigilancia epidemiológica del síndrome febril (Martínez-Medina *et al.*, 2007).

Las mejores herramientas de diagnóstico basadas en gran parte en técnicas moleculares permiten una detección más sensible y específica de los patógenos (Chomel, 2011), y durante la última década han demostrado ser útiles para el diagnóstico de confirmación de muchas ECTV, mientras la serología o la citología han sido utilizadas históricamente en estudios epidemiológicos o para confirmar un diagnóstico clínico, respectivamente (Otranto *et al.*, 2009). Los datos sobre las infecciones transmitidas por vectores en los caninos pueden proporcionar información importante para estimar el potencial de infección humana en una determinada ubicación geográfica (Duncan *et al.*, 2005), estos elementos han llevado al reconocimiento de las enfermedades transmitidas por garrapatas en áreas usualmente consideradas libres de esas infecciones (Beugnet y Marie, 2009).

1.2.2.5.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se basa en la detección de anticuerpos (Ac) en el suero del paciente, puestos de manifiesto mediante una anti-inmunoglobulina humana marcada con fluoresceína que en caso de una reacción positiva, permite la visualización de las rickettsias mediante el microscopio de fluorescencia; la IFI es usada para detectar las inmunoglobulinas IgM e IgG, tanto en fase aguda de la enfermedad como en la convalecencia. En general, están

establecidos como punto de corte, títulos de IgG \geq 1: 64 e IgM \geq 1: 32. La prevalencia de Ac en la población sana puede ser elevada, y un simple título de Ac no se considera, por sí solo, diagnóstico de infección activa. La confirmación del diagnóstico de rickettsiosis requiere una seroconversión (es decir pasar de la no detección de Ac a ser detectados) o un sero-refuerzo (aumento mínimo de cuatro veces del título entre el primer suero y el de convalecencia). En el contexto de un síndrome clínico compatible con rickettsiosis una determinación de Ac de tipo IgM puede ser muy sugestiva de rickettsiosis, aunque también puede ser un falso positivo por la presencia de factores reumatoides tipo IgM y otras reacciones cruzadas. Es importante tener en cuenta que la IFI no permite identificar la especie de *Rickettsia*, y la técnica nunca será tan específica como el cultivo o los métodos moleculares (Oteo *et al.*, 2014).

En México el estándar de oro para el diagnóstico serológico es la IFI, realizada en muestras pareadas para demostrar un incremento de cuatro o más veces el título de anticuerpos. Debido a que los Ac comienzan a detectarse de 7 a 10 días después del inicio de los síntomas, un resultado negativo antes de 7 días no descarta la infección por *Rickettsia spp.* Los Ac IgM e IgG usualmente se detectan al mismo tiempo y ambos permanecen elevados por meses o a veces por años, aunque los Ac IgM son menos específicos y para la fiebre manchada de las Montañas Rocosas los Ac IgM comienzan a disminuir después de 3 a 4 meses, mientras los de la clase IgG persisten de 6 a 8 meses (InDRE, 2015).

1.2.2.5.2. Cultivo de rickettsias. Es la técnica diagnóstica más específica y como tal, se considera la prueba de referencia o estándar de oro. Además, resulta fundamental para la obtención de antígenos y para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos. También es necesaria para establecer una nueva especie de *Rickettsia*. Sin embargo, el aislamiento de rickettsias mediante cultivo celular convencional a partir de una muestra procedente de un paciente con rickettsiosis, es un proceso muy laborioso y solamente se realiza en laboratorios especializados. Las muestras deben manejarse como potencialmente peligrosas y se requiere un nivel 3 de bioseguridad (Oteo *et al.*, 2014).

1.2.2.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica fue desarrollada por Kally Mullis en 1985 y consiste en obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN, a partir de un mínimo amplificado de un fragmento de ADN, permitiendo una fácil identificación de microorganismos (Osorio, 2009). Una vez obtenido un resultado positivo se debe proceder a la secuenciación de los ácidos nucleicos editados mediante el empleo de un *software* específico y se compara utilizando secuencias de referencia o bien directamente en GenBank mediante el programa BLAST del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Oteo *et al.*, 2014).

Los métodos moleculares basados en la PCR se han convertido en herramientas rápidas, sensibles y específicas para la detección e identificación de rickettsias en distintos tipos de muestras como sangre, suero, biopsias cutáneas, líquido cefalorraquídeo, exudados, raspado de escaras y garrapatas (Oteo *et al.*, 2014; Santibáñez, 2014). Constituye una herramienta muy útil para el diagnóstico de rickettsiosis en las fases tempranas de la enfermedad (Santibáñez, 2014), porque se pueden obtener resultados positivos antes que ocurra una seroconversión (Raoult y Parola, 2007); además son útiles para confirmar la infección activa (Gutiérrez *et al.*, 2009), al ser utilizada previo a los siete días, para llevar a cabo un diagnóstico oportuno a partir del tiempo en el cual los pacientes acuden a los servicios médicos (InDRE, 2015).

Se ha identificado *Rickettsia spp.* mediante PCR con el uso de diversas dianas entre las que se encuentran el gen que codifica las proteínas citrato sintasa (*gltA*, presente en todas las rickettsias) y los genes que codifican las proteínas de superficie *OmpA* (presente en todas las especies de rickettsias del GFM) y *rOmpB* (presente en todas las rickettsias, excepto *R. bellii*); existen otras dianas menos específicas como el gen *htrA* que codifica una proteína antigénica de 17kDa, también el gen *sca4* y el menos específico pero siempre presente el gen 16S del ARN ribosomal, con los cuales se ha permitido la detección de nuevas especies de *rickettsia* y su implicación patológica (Oteo *et al.*, 2014; Santibáñez, 2014). Las PCR que utilizan como diana un fragmento del gen *gltA* (extremo 5´) permiten detectar

Rickettsia spp. en el 85.1% de los artrópodos y 33.3% en muestras clínicas (Santibáñez, 2014).

1.2.3. Diversidad genética

Se ha reportado variedad genética en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y en *Rickettsia rickettsii* en América. En relación a las garrapatas *R. sanguineus* Eremeeva *et al.* (2011), en un estudio realizado en Mexicali, Baja California, México, mencionó diferencias genéticas entre las garrapatas *R. sanguineus* de su estudio y *R. sanguineus* encontradas en los Estados Unidos; se estableció que las garrapatas de Arizona y Mexicali pertenecen a dos linajes genéticos diferentes dentro del complejo *R. sanguineus* descrito por Szabo *et al.* (2005). Se propone la necesidad de una reevaluación a fondo de la situación taxonómica de las garrapatas del complejo *R. sanguineus* en el Nuevo Mundo para entender mejor su papel en la transmisión a los seres humanos y los animales (Eremeeva *et al.*, 2011). Este conocimiento puede contribuir a una comprensión de las diferencias regionales en la epidemiología de las enfermedades transmitidas por *R. sanguineus*.

Respecto a *Rickettsia rickettsii* el mismo autor, detectó la circulación de un tipo genético único de *Rickettsia rickettsii* en las garrapatas del complejo *R. sanguineus* en Mexicali, Baja California Norte, México, donde la *R. rickettsii mexicana* difiere de todos los aislados previamente caracterizados de las regiones endémicas de las Fiebres Manchadas de las Montañas Rocosas en norte, centro y sur de América.

Por otra parte Clark *et al.* (2015), en un estudio de laboratorio, refiere la presencia de cepas de *R. rickettsii* dramáticamente diferentes en la virulencia, la cual fue comparada en un modelo de infección de cobaya; la gravedad de la enfermedad según la evaluación varió desde el más virulento con respuesta febril, (Sheila Smith), al que no causa fiebre (Iowa), y por comparación de secuencias genéticas se estudiaron dos cepas comunes de *R. rickettsii* (Morgan y Montana), se compararon con la cepa avirulenta (Iowa) y virulenta (Sheila Smith). Las cepas Montana y Sheila Smith (virulenta) resultaron ser muy similares, mientras las cepas de Iowa (avirulenta) y Morgan, eran más similares entre sí, estrechando así el campo de posibles factores de virulencia.

Los diferentes aislados de *R. rickettsii*, han mostrado diversos niveles de patogenicidad en cultivos de células endoteliales, esto podría explicar en parte, la variación de la gravedad de la enfermedad en distintas regiones geográficas (Dantas-Torres, 2007).

Existen diversos aspectos que propician la investigación genética sobre *R. rickettsii* canina:

- a) Los caninos juegan un papel importante en la sociedad, son compañeros en muchos hogares, contribuyen al desarrollo físico, social y emocional de las personas, especialmente de los niños y de los adultos mayores, pero también pueden transmitir enfermedades a través de vectores, causando una gran morbilidad en todos los grupos de la población humana y con particular importancia en los más vulnerables como los niños, ancianos e inmunocomprometidos.
- b) Las enfermedades infecciosas y parasitarias han adquirido una prevalencia creciente debido a los movimientos migratorios y al aumento del turismo.
- c) Estrecha relación de convivencia de los humanos con los caninos.
- d) Elevada infestación domiciliar por garrapatas caninas capaces de adaptarse y morder al ser humano.
- f) Evidencia de que *R. sanguineus* expuestas a altas temperaturas incrementan su agresividad, se unen y se alimentan de los seres humanos con mayor rapidez.
- g) Creciente número de casos de parasitismo humano por garrapatas *R. sanguineus* indican la interacción entre el humano y esta garrapata más común de lo que se reconoce en realidad.
- h) Mayor evidencia a la existencia de exposición humana a *R. rickettsii* en nuestro medio, debido a la convivencia cercana con caninos enfermos (Parola *et al.*, 2008; Dantas-Torres, 2008).

Por lo anterior la identificación genética y la relación entre *R. rickettsii* canina, y *R. sanguineus*, es fundamental para interpretar su epidemiología y riesgo para la salud pública por la estrecha relación humanos-caninos.

CAPÍTULO 2. *Rhipicephalus sanguineus* EN CANINOS EN SINALOA, MÉXICO.

2.1. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida: Ixodidae), es conocida como la garrapata marrón del perro y es el más común ectoparásito de los caninos domésticos, ocasionalmente parasita otros hospederos, incluidos los humanos (Dantas-Torres, 2008), a cuyo entorno urbano está bien adaptada (Parola y Raoult, 2001). Es de tamaño pequeño a mediano, ambos sexos presentan un color marrón oscuro, sin ningún tipo de ornamentación, los palpos son cortos y el gnatosoma posee prominentes ángulos laterales que le confieren una forma hexagonal; los ojos sencillos son ligeramente convexos, los estigmas respiratorios en forma de coma; la Coxa I, con dos espolones grandes de tamaño similar; el macho tiene un escudo que le cubre por completo la parte dorsal, con tres surcos profundos en la parte posterior, en la parte ventral tienen una placa bien desarrollada y otra accesoria, menos evidente a cada costado del ano; en la hembra el escudo dorsal cubre hasta el primer tercio del cuerpo, más largo que ancho y se angosta en la región post-ocular; una hembra ingurgitada pesa de 100 a 250 mg, el tamaño aproximado de una hembra en ayuno es de 1,5 a 2,0 mm de ancho y de 3,0 a 4,0 mm de largo (Guglielmone *et al.*, 2009).

Los datos morfológicos y moleculares indican que *R. sanguineus* representa un complejo de especies y al menos cuatro taxones diferentes se han identificado bajo el nombre de *R. sanguineus*, presentando variación en la competencia del vector y la capacidad de esta garrapata para albergar a diferentes patógenos en todo el mundo (Dantas-Torres *et al.*, 2013); como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* (Dantas-Torres, 2008); *Babesia vogeli* *Hepatozoon canis* y *Rickettsia rickettsii* a través de los cuales pueden causar enfermedades con manifestaciones clínicas, desde anemia hasta abscesos de piel (Gray *et al.*, 2013).

R. sanguineus está ampliamente distribuida en todo el mundo, entre 50° N y 35° S, en América está presente desde Canadá hasta Argentina (Morales-Soto M y Cruz-Vázquez C., 1998) y se ha descrito su presencia, en diferentes países como Brasil (Silveira *et al.*, 2009), Argentina (Gervasoni *et al.*, 2003), y en México se ha

identificado en Cuernavaca, Morelos (Cruz-Vázquez y García-Vázquez, 1999), Mexicali, Baja California Norte (Tinoco-Gracia *et al.*, 2009a), en el estado de Nuevo León (Galaviz *et al.*, 2013) y Culiacán, Sinaloa (Gaxiola *et al.*, 1997).

Además de afectar directamente tanto animales como humanos la garrapata *R. sanguineus* se ha relacionado en la epidemiología de agentes patógenos zoonóticos, tal como lo menciona Demma *et al.*, (2005), en un estudio en Arizona (USA), donde demuestra que *R. sanguineus* desempeña un papel muy importante en la transmisión natural y la epidemiología de *R. rickettsii* en la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), ya que el hábitat doméstico y la amplia distribución de *R. sanguineus* son una causa de preocupación sobre la exposición humana a este vector y la introducción de la FMMR en áreas en las que no habían sido previamente reconocidos.

En México se le ha asociado con la presencia de *Rickettsia rickettsii* en caninos en la ciudad de Mexicali, Baja California, donde la prevalencia fue de 64.4% de *R. rickettsii* en caninos (Zermeño *et al.*, 2012).

El ciclo biológico de *R. sanguineus* incluye la interacción con tres hospederos, las mudas ocurren fuera de estos, los sitios preferidos de fijación sobre el perro son las orejas, el cuello, dorso, cabeza y espacios interdigitales. Bajo condiciones climáticas favorables las larvas y ninfas se alimentan sobre los perros por un período de 3 a 7 días, respectivamente; en tanto las garrapatas hembra necesitan de 7 a 12 días para completar su alimentación; los machos pueden permanecer más tiempo sobre el hospedero; la muda de larva a ninfa dura de 8 a 11 días y la de ninfa a adultos requiere de 11 a 23 días; en conjunto el período de preoviposición y oviposición puede alcanzar 17 a 27 días en las cuales pueden ovopositar alrededor de 3000 a 4000 huevos; en su etapa adulta puede sobrevivir de 155 a 568 días sin alimentarse. Las garrapatas son más abundantes durante la primavera-verano y la mayoría de los casos agudos ocurren durante este período (Guglielmone *et al.*, 2009).

R. sanguineus, además de sus características endofílicas, perfectamente adaptada al ambiente doméstico, expuesta a altas temperaturas se une y alimenta de los seres humanos con mayor rapidez, lo cual aunado a la estrecha relación de

convivencia dada entre humanos y caninos (Parola *et al.*, 2008), incrementa la posibilidad de que estos puedan ser atacados por garrapatas infectadas (Cunha *et.al.*, 2009). Esto hace suponer que el riesgo de parasitismo humano por garrapatas podría aumentar en las zonas con veranos cálidos, tales como el estado de Sinaloa, con la consecuente transmisión de agentes zoonóticos, generando las condiciones propicias para la presentación de enfermedades con un alto riesgo para la salud pública. Por lo antes descrito el objetivo del presente fue caracterizar morfológica y genéticamente garrapatas presentes en los caninos que son atendidos en las diferentes clínicas veterinarias de las ciudades de Los Mochis, Culiacán y Mazatlán del estado de Sinaloa.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Muestreo: los caninos se muestrearon mediante “selección intencionada o muestreo por conveniencia”, técnica de muestreo no probabilístico descrita por Thrusfield (2005); la colección de muestras se realizó durante el año, con énfasis en los meses considerados de mayor prevalencia de garrapatas (marzo-septiembre), considerando 320 caninos atendidos en clínicas veterinarias de las ciudades: Los Mochis, Culiacán y Mazatlán, del estado de Sinaloa; donde predominan las siguientes características:

- a) Los Mochis, localizada entre los paralelos 25° 27' y 26° 25' de latitud norte; los meridianos 108° 45' y 109° 28' de longitud oeste; altitud entre 0 y 700 m., con rangos de temperatura de 22-26°C y rango de precipitación de menos de 200-500 mm., con clima muy seco muy cálido y cálido (97.58%), seco muy cálido y cálido (2.42%).
- b) Culiacán, localizada entre los paralelos 24° 02' y 25° 17' de latitud norte; los meridianos 106° 52' y 107° 49' de longitud oeste; altitud entre 0 y 1800 m., con rango de temperatura de 18-26°C y rango de precipitación de 400-1100 mm., con clima seco muy cálido y cálido (37.40%), semiseco muy cálido y cálido (31.96%), cálido subhúmedo con lluvias en verano de humedad media (29.11%), cálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad

(1.49%), y semicálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad (0.04%).

c) Mazatlán, localizada en la parte sur del estado, entre los meridianos 105° 46' y 106° 30' al oeste del meridiano de Greenwich, y entre los paralelos 23° 04' y 23° 50' de latitud norte, existen varias clases de clima en el municipio, en el centro, sur y este del territorio, predomina el cálido subhúmedo con lluvias en verano; hacia el norte existen templados semicálidos, subhúmedos con lluvias en verano, y en el oeste del municipio es semiseco muy cálido con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 25°C, con una precipitación promedio anual de 740 mm (INEGI, 2011).

2.2.2. Criterios de Inclusión: caninos atendidos en los lugares mencionados, con presencia de garrapata, de cualquier raza, sexo y edad.

2.2.3. Criterios de exclusión: se rechazaron muestras sin etiqueta o rótulo de identificación, sin fecha o datos incompletos.

2.2.4. Colecta y procesamiento de muestras: las garrapatas se retiraron de los caninos mediante el procedimiento descrito por Needham (1985), y Gammons y Salam (2002), conservándolas a -20°C en tubos eppendorf de 1.5 mL (Parola y Raoult, 2001). El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Boulevard San Ángel S/N, Fraccionamiento San Benito, Predio Las Coloradas, Culiacán, Sinaloa, México.

2.2.5. Identificación morfológica de garrapatas: las garrapatas se identificaron con base en las claves morfológicas del manual de identificación taxonómica de garrapatas (DGSA, 2004), y con la clave pictórica (Benavides y López, 2005), observándose en microscopio estereoscópico las estructuras de: capitulum (base del capituli, palpos, hypostoma), apertura genital, placa espiracular, surco anal, placa adanal 1ra coxa (espolones internos y externos), 4ta coxa, escudo dorsal y festones

(Figura 5); la clasificación se realizó teniendo en cuenta procedencia y hospedero, género, especie, estadio evolutivo (larva, ninfa y adulto) y sexo (hembra y macho adulto), con estos datos se generaron 64 lotes de garrapatas (**Cuadro 2**).

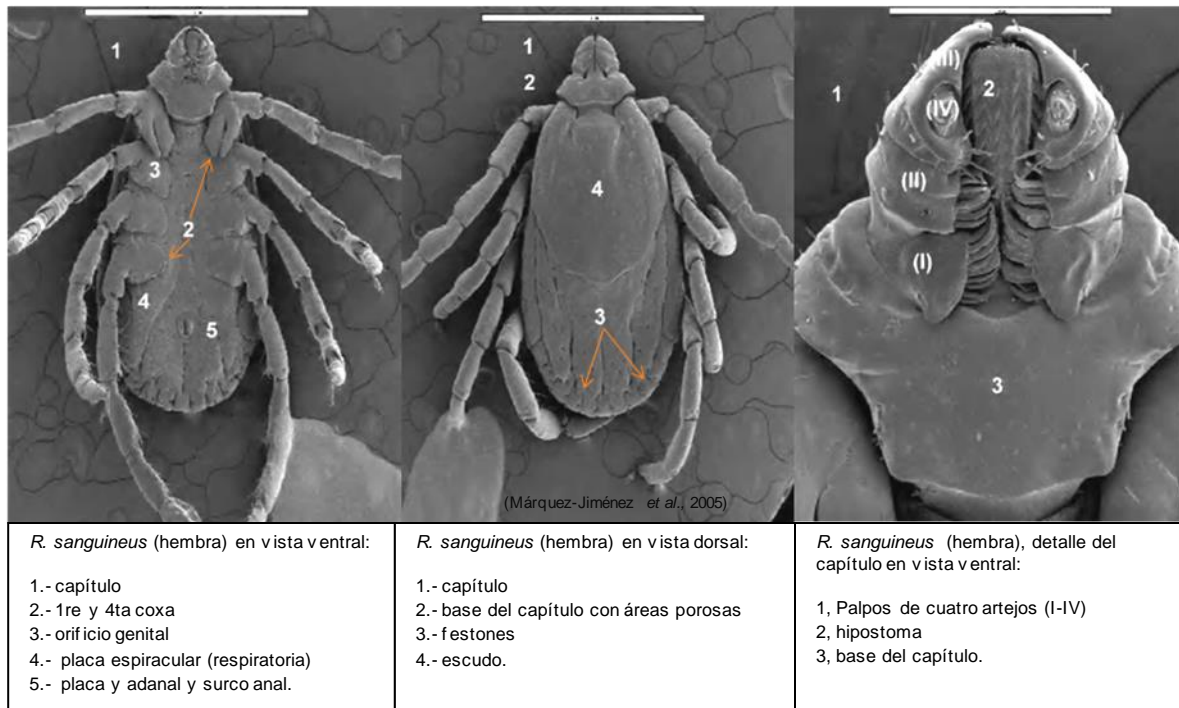


Figura 5. Regiones morfológicas para la identificación de *R. sanguineus* (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

2.2.6. Extracción de ADN de muestras: a partir de los 64 lotes generados de garrapatas caninas se realizó la extracción de ADN con el QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN® (MacroGen Corp. Rockville, MD 20850 USA) con el contenido de la maceración de las garrapatas, siguiendo las indicaciones del fabricante. La pureza de cada muestra de ADN se verificó a partir de 5 μ L de la muestra, se homogenizó con 2 μ L de azul de bromo fenol, se colocó en gel de agarosa al 2% teñido con Gelred® (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA) y sometido a una diferencia de potencial por medio de una cámara de electroforesis a 80 volts, 250 mA durante 30 min observado con luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): la amplificación del ADN obtenido, se realizó por PCR, inicialmente preparando una mezcla de reacción a un

volumen de 25 µL (Buffer 5X, MgCl₂, dNTPs, H₂O inyectable estéril, Taq polimerasa, oligonucleótidos y ADN). La reacción se llevó a cabo en un termociclador BioRad® multigene T100 (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA) para la amplificación del fragmento de 460 pb del gen 16S ARNr mitocondrial a partir del ADN de los 64 lotes de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, obtenidos durante la identificación morfológica previa. Las secuencias de oligonucleótidos usadas fueron: 16S+1: 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3' y 16S-1: 5'-GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T-3' (Moraes *et al.*, 2011, Mangold *et al.*, 1998), las condiciones de reacción incluyeron un primer paso de desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 92°C por 30 s, 50°C durante 30 s para alineamiento y 72°C por 45 s para extensión y un paso final de extensión a 72°C por 8 min.

2.2.8. Purificación de ADN: los productos amplificados se purificaron a través de columnas QIAquick Gel Extraction kit (QUIAGEN® Macrogen Corp. Rockville, MD 20850 USA) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante.

2.2.9. Visualización de ADN amplificado y purificado: los productos de amplificación y purificación de ADN fueron identificados por visualización de bandas (~460 pb) mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con Gelred® (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA), en cada corrida electroforética se incluyeron 10 µL del producto de PCR y/o purificado de cada muestra, los correspondientes controles positivos y un marcador de tamaño de 50 pb. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) a 340 nm, para evidenciar las bandas de ADN compatibles en tamaño con el fragmento de los genes en estudio.

2.2.10. Secuenciación: las muestras positivas resultantes de la amplificación por PCR del gen 16S ARNr, fueron secuenciadas mediante el sistema 3730XL Applied Biosystems®, en la empresa Macrogen inc., Seoul, Korea.

2.2.11. Análisis *In Silico*: el análisis *In Silico* se realizó con las secuencias genéticas obtenidas, comprobando con el cromatograma de cada muestra secuenciada, la

identidad de los nucleótidos y corrección de errores de lectura, con el uso del software editor de secuencias y alineamientos múltiples BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), obteniendo secuencias genuinas que permitieron su alineamiento y comparación homóloga con las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NIH), mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); los alineamientos de las distintas secuencias se realizaron con el programa en línea Clustal Omega (European Molecular Biology Laboratory EMBL-EBI 2015).

Para el análisis de diversidad genética se consideró el porcentaje de variación de nucleótidos entre secuencias de una misma especie, se calcularon por comparación por pares (Kimura modelo de 2-parámetros), utilizando el software MEGA6. La comparación del par de diferencias de secuencia (D) entre secuencias de consenso se calcularon utilizando la siguiente fórmula $D = 1 - (M / L)$, donde M es el número de posiciones de alineación donde las dos secuencias tienen una base en común, y L es el número total de posiciones de alineación sobre el que las dos secuencias se comparan (Dantas-Torres *et al.*, 2013).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del muestreo realizado a los 320 caninos, cuya procedencia geográfica se indica en el **Cuadro 1**, se examinó la morfología de 642 garrapatas y con base a las estructuras descritas (**Figura 5**) se observó el 100% (642) de las garrapatas con las características morfológicas propias de *Rhipichepalus sanguineus* (**Figura 6**). Gaxiola *et al.* (1997) en un estudio realizado en dos colonias de diferente nivel socioeconómico de la ciudad de Culiacán, Sinaloa también identificaron a *R. sanguineus* en el 100% de las garrapatas colectadas de 46 caninos; asimismo esta especie fue identificada morfológicamente en el 100% de las garrapatas colectadas en caninos, en la ciudad de Mexicali, Baja California Norte en dos estudios, realizados por Tinoco-Gracia *et al.* (2009a); en el primer trabajo colectaron garrapatas de 54 caninos de 10 clínicas privadas y 40 capturados por personal del centro veterinario de control de rabia y en el segundo estudio (Tinoco-Gracia *et al.*,

2009b), identificaron esta especie en 384 caninos callejeros capturados por el personal del Centro Municipal de Control Animal durante los meses de junio y julio de 2009. También en Cuernavaca, Morelos (Cruz-Vázquez y García-Vázquez, 1999) se encontraron garrapatas *R. sanguineus* en 349 caninos de dos clínicas veterinarias privadas. Resultados similares se han encontrado en el estado de Nuevo León donde el 94.6% de las garrapatas aisladas de 337 caninos fueron *R. sanguineus* (Galaviz *et al.*, 2013); asimismo, Pino de la Llave (2006), identificó a esta especie en el 82% (194) de 238 garrapatas colectadas de 100 caninos atendidos en la clínica hospital veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana en la ciudad de Veracruz, Veracruz.

Cuadro 1. Distribución de caninos muestreados en clínicas veterinarias, en las ciudades: Los Mochis, Culiacán y Mazatlán, Sinaloa.

Procedencia	Caninos muestreados
Los Mochis	120
Culiacán	157
Mazatlán	43
TOTAL	320

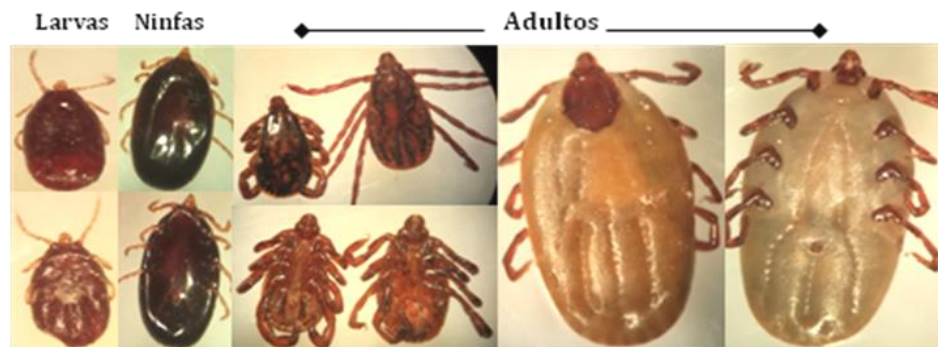


Figura 6. Estadios evolutivos *R. sanguineus* observadas, con base en claves dicotómicas.

En otros países de América nuestros hallazgos concuerdan con Silveira *et al.* (2009), quienes identificaron morfológicamente a *R. sanguineus* en el 100% de 7318

garrapatas de caninos de la ciudad de Belo Horizonte, Brasil y con Ramírez-Barrios *et al.* (2008) quienes analizaron 624 garrapatas de 64 caninos atendidos en el servicio de consulta externa de la Policlínica Veterinaria Universitaria de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela. En Argentina, Gervasoni *et al.* (2003), encontraron 99.8% de garrapatas *R. sanguineus* (420) y una (0.2%) *Amblyomma tigrinum*, procedentes de 69 caninos atendidos en clínicas veterinarias en la ciudad de Santa Fe; también en Argentina en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires; Cicuttin *et al.* (2014), reportaron 91.46% (75) de *R. sanguineus*, y 8.54% (7) de *Amblyomma tigrinum*, obtenidas de 56 caninos domésticos sanos los cuales concurren al programa de esterilizaciones quirúrgicas. En el sureste de Uruguay, Venzal *et al.* (2007) reportó 92% de *R. sanguineus* de 744 garrapatas colectadas de caninos en clínicas veterinarias; en Colombia de 126 garrapatas capturadas sobre caninos, el 96,6% (122) fueron clasificadas como *R. sanguineus*, el 2,4% (3) como *A. cajennense*, y el 0,8% (1) como *A. ovale* (Faccini-Martínez *et al.*, 2014).

En Europa Papazahariadou *et al.* (2003), en Thessaloniki, Grecia, observaron 89.3% de *R. sanguineus* de un total de 2812 garrapatas colectadas de 249 caninos procedentes del hospital de enseñanza Veterinaria y de cuatro clínicas privadas.

Por lo anteriormente descrito, se concuerda con Debárbora, *et al.* (2011), al mencionar que *R. sanguineus* es un complejo de especies de origen africano que en la actualidad tiene una distribución cosmopolita como resultado de su dispersión por las migraciones humanas que han transportado caninos (el hospedador principal) de un continente a otro, y se ha constituido en uno de los ectoparásitos más importantes de estos animales domésticos en el neotrópico. Las especies que forman este complejo son endofílicas y desarrollan la fase no parasitaria de su ciclo en viviendas o edificios habitados por caninos. Este comportamiento minimiza la influencia de las condiciones ambientales externas sobre el desarrollo de cada estadio, y es lo que permite explicar el hallazgo con altos niveles de prevalencia de *R. sanguineus*.

Cuadro 2. Agrupación de garrapatas por estadio evolutivo (larva, ninfa y adulto) y sexo (hembra y macho adultos), colectadas de caninos atendidos en clínicas veterinarias, en las ciudades: Los Mochis, Culiacán y Mazatlán, Sinaloa.

	Total		Lotes
Larva	3 (0.5%)		1
Ninfa	90 (14%)		11
Adultos	549 (85.5%)	Hembras 282 (44%)	26
		Machos 267 (41.5%)	26
Total	642		64

Para la identificación genética de las garrapatas, una vez caracterizadas morfológicamente, se agruparon considerando los criterios de clasificación por procedencia del hospedero, estadio evolutivo (larva, ninfa y adulto) y sexo (hembra y macho adulto), como se muestra en el **Cuadro 2**, en el cual se aprecia que la mayoría de de las garrapatas colectadas (85.5%) fueron adultas, y en cuanto a sexo tienen una distribución casi homogénea entre ambos. Se generaron 64 lotes con diferente número de especímenes (1 a 13), de los cuales se extrajo ADN, y se procesaron mediante PCR, obteniendo amplificación (**Figura 7**) y secuenciación (**Cuadro 3**) de las regiones diana de un fragmento del gen 16S ARNr, de ~460 pb de *R. sanguineus* de 10 lotes de garrapatas; las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del GenBank.

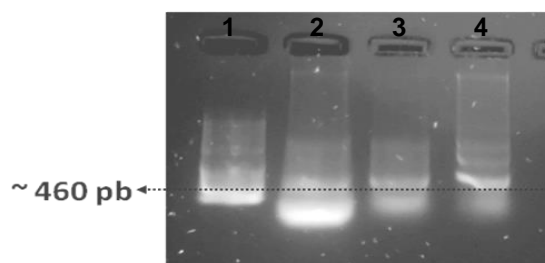


Figura 7. Visualización en gel agarosa al 2%, de la amplificación del fragmento de ~460 pb del gen 16S *rRNA* de *R. sanguineus*, carriles 1-4.

Cuadro 3. Secuencias obtenidas de la amplificación por PCR de las regiones diana de un fragmento del gen 16S ARNr, de ~460 pb de *R. sanguineus* en caninos de Sinaloa.

Muestra	Secuencias obtenidas
43HA Los Mochis	AATCCCATCTTTTCGTAAGACTC TCCATCG TTCATTCA TTA AAAAAG TA TCC TAA TCCAACA TCGAGG TCGCAAAC TTTTTGTCA ATATGATCTATCAAAAAATA TAACGCTG TTA TCCCTAGAGTATTTAACA TAAAATCA TTAATAA TGGA TCATTTTATTTTAAAAAG TTCATAATATTTC TAGCCGCCCCAGCCAAAA TTTTC TAA TAG TAATTACA TA TAAA TAAAAA TTAATAAA TTCA TAGGGTCTT CTTGTC TTTAATA TAATAA TTGTTTCTGACACAAA TTA AAAA AACTTCAA TTTTAA TTTAAAAA AAG TTTTTCTGGAC TTCCATT CTC TTAGCATTCAATTA AAA TCTTA TTTCAA TACC TTTG TA TAG TCAAAATACTACAGCAATTTAAAA TCCATTGAGCAAAAAA AAAAAAAAAA
C1HN Los Mochis	ATTTTCTACGTTTCA TTAGCATTCAA TCATTC TTCATTTA TATAAAG TCA TCCTAA TCCAACA TCGAG GTCGCAAAC TTTTTGTCA AATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTA TCCCTAGAG TATTTAACA TAAAA TCAT TAA TAATGGA TCATTTTATTTTAAAAA GTTCATAATATTTC TAGCCGCCCCAGCCAAAA TTTTCTAATA GTAA TTACATA TAAATAAAAA TTTAA TAAATTCATAGGGTC TTTCTGTCTTTAA TATAA TAA TTG TTTCTGACACAAA TTA AAAA AACTTCAA TTTTAA TTTAAAAA GTTTTTTCTGGACTTCCA TTCTTTAGCATTCAA TAAAA TC TTA TTTCAATACCTTTGTATAGTCAAAA TACTACAGCAATTTAAAA TCCATTGAGCACC GGAAAAAATTAATTT
RR1 Culiacán	NANTCCGATNGACCANGNNGAATAAGATTTTAA TTAGAA TGCTA AGAGAA TGGAAG TTCAGAAAAA AACTTTTTTAAAT TAAAAATCGAAGTTTTTAA TTTGTGCAGAAACAA TTTTATTA TATTAAGACAAGAA GACCCTA TGAA TTTATTAATTTTTATTTAATATGTAATTACTATAGAAAA TTTTGGCTGGGGCGCTA GAAAA TTA TGA ACTTTTTAAAAA TAAATGATCCATTA TTA ATGATTTTATG TTAATACTCTAGGGATAACAGCG TTTATTTTTTGA TAGATCA TTTGACAAAAA GTTTGCGACCTCGATGTT GGATTAGGATAC TTTTAA TGAAGA TTA AAAA AAG AAG TTTGTCAAC TTTTAA TTTCC TACTTGATC TGG TACAG AACACCG GGGTCTTGA
RR2 Culiacán	NTNNGNAANGANANTGNGTACNNCANGATTTTGA TTGAA TGC TAGGAGAA TGGAAG TCCAGAAAAA AACTTTTTTAAAT TAAAAATGAAAGTTTTTAA TTTG TGCAGAAACAA TTTTATA TATTAAGACAAGAA GACCCTA TGAA TTTATTAATTTTTATTTA ATATGTAATTACTATAGAAAA TTTGGCTGGGGCGCTA GAAAA ATTA TGA ACTTTTTAAAAA TAAATGATCCATTA TTAAT GATTTTTATG TTAATACTCTAGGGATAACAGCG TTTATTTTTTGA TAGATCA TTTGACAAAAA GTTTGCGACCTCGATGTTG GATTAGGATAC TTTTAA TGAAGA TTA AAAA AAG AAG TTTGTCAAC TTTTAA TTTCC TACTTGATC TGG TACAG AACACCG GCTCTGCN
RR3 Culiacán	AAACCGACATTCAGGGTTTGA TAA GAATTTAA TTTGAA TGCTAAGA GAA TGGAAG TTCAGAAAAA AACTTTTTTAAAT TAAAAATGAAAGTTTTTAA TTC TG TGCAGAAACAA TTTTATA TATTAAGACAAGAA GACCCTA TGAA TTTATTAATTTTTATTTAATATGTAATTAC TATA GAAAA TTTTGGC TGGGCGGGCTAGAAAA TATTA TGA ACTTTTTAAAAA TAAATGATCCATTA TTAATGATTTTTATG TTAATACTCTAGGGATAACAGCG TTTATTTTTTGA TAGATCA TTTGACAAAAA GTTTGCGACCTCGATGTTG GATTAGGATAC TTTTAA TGAAGA TTA AAAA AAG AAG TTTGTCAAC TTTTAA TTTCC TACTTGATC TGG TACAG AACACCG GGGGAGATTATTTAAAAA AAAAAACAA T
RR4 Culiacán	AAAAACAACAAC AAGGATTGAA TAA GAATTTAA TTGAA TGC TAA GAGAA TGGAAG TCCAGAAAAA AACTTTTTTAAAT TAAAAA TTGAAGTTTTTAA TTTG TGCAGAAACAA TTTTATA TATTAAGACAAGAA GACCCTA TGAA TTTATTAATTTTTATTTAATGTTAATAC TTTAGAAAA TTTGGCTGGGGCGCTA GAAAA TTA TGA ACTTTTTAAAAA TAAATGATCCATTA TTAATGATTTATG TTTAA TACTCTAGGATAACAGCG TTTA TTTTTTGA TAGATCA TATTGACAAAAA GTTTGCGACCTCGATGTTG GATTA GGATAC TTTTAA TGAAGA TTA AAAA AAG AAG TTTGTCAAC TTTTAA TTTCC TACTTGATC TATCCCAACCGGAAACCGGA ATTTAAAAATTTAAAAA AAAAAATAA
21MN Mazatlán	TGGGAACCCATATTGAGAAG GAAATTTAAAAATCA TTGAGCACCCTAA TTTAAAA TA TCATTGACCACCTTTTTTG TCAATATG ATCTATCAAAAAATAACGCTG TTA TCCCTAGAGTATTTAACA TAAAATCA TTAATAA TGATCA TTTTATTTTAAAAAG TTCAATATAATTTCTAGCCGCCCCAGCCAAAA TTTTCTA TAG TAATTACA TATAAAA TAAAA TTTAATAA TTCA TAGGGTCTTCTTTAATA TAAATAA TTGTTTCTGACACAAA TTA AAAA AACTTCAA TTTTAA TTTAAAAA AAG TTTTTCTGGACTTCCA TTC TTT AGCATTCAATAAAA TC TTA TTTCAATACCTTTGTATAGTCAAAA TACTACAGCAA TTTAAAA TCCATTGAGCCAGCAGCAAT TAAAAATCATTGAGCACAGCAA TTTAAAAA TCAATTGAGCACAG
23 MA Mazatlán	CTATCTTAACAGCCGCTGCTGCTTTTCATATC TCA TTA AAAAAG TA TCC TAA TCCAACA TCGAGG TCGCAAAC TTTTTGTCA ATATGATCTATCAAAAAATA TAACGCTG TTA TCCCTAGAGTATTTAACA TAAAATCA TTAATAA TGGA TCATTTTATTTTAAAAA GTTCATAATATTTC TAGCCGCCCCAGCCAAAA TTTTCTA TAG TAATTACA TATAAAA TAAAA TTTAATAA TTCA TAGGGTCTTCTTTGTC TTTAATA TAAATAA TTGTTTCTGACACAAA TTA AAAA AACTTCAA TTTTAA TTTAAAAA AAG TTTTTCTGGACTTCCA TTC TTTCTTAGCATTCAATTA AAA TCTTA TTTCAA TACC TTTG TA TAG TCAAAATACTACAGCAATTTAAATCCA TTTGAAGAAAAA C GGTTTTTTAAGGTTCTTTGAGCAAAA GG
25 MA Mazatlán	TACGTTGTACGATCTTTTGA TAGCACCA TACTTCA TTA AAAAAG TATCC TAA TCCAACATCGAGG TCGCAAAC TTTTTGTCA AATATGATCTATCAAAAAATATAACGCTGTTA TCCCTAGAG TATTTAACA TAAAA TCAT TAA TAATGGA TCATTTTATTTTAAAAA GTTCATAATATTTC TAGCCGCCCCAGCCAAAA TTTTCTAATA GTAA TTACATA TAA TAAAA TTTAA TAAATTCATAGGGTCT TCTTGGCTTTAATA TAAATAA TTGTTTCTGACACAAA TTA AAAA AACTTCAA TTTTAA TTTAAAAA AAG TTTTTCTGGACTTCCA TTC TTTAGCATTCAA TAAAA TC TTA TTTCAATACCTTTGTATAGTCAAAA TACTACAGCAATTTAAAAA TCGAGCAAGACCGG TTTTTAAAAA TCGATGAGGCACAGCTTTTAAAAA TCAATTGAGCA
42HN Mazatlán	AATTCATACCACAAC TCGATTTGTTTCA TATC TTCATTAAAAA GTATCCTAA TCCAACATCGAGG TCGCAAAC TTTTTGTCAAT ATGATCTATCAAAAAATAACGCTG TTA TCCCTAGAGTATTTAACA TAAAATCA TTAATAA TGGA TCATTTTATTTTAAAAA GTTCATAATATTTC TAGCCGCCCCAGCCAAAA TTTTCTAATA TAG TAA TTTACA TATTA AAA TAAAA TTTAA TAAATTCATAGGGTCT TCTTGGCTTTAATA TAAATAA TTGTTTCTGACACAAA TTA AAAA AACTTCAA TTTTAA TTTAAAAA AAG TTTTTCTGGACTTCCA TTC TTTAGCATTCAATTA AAA TC TTA TTTCAATACCTTTGTATAGTCAAAA TACTACAGCAATTTAAAAATCA TTTGAGCAAAAAA AATTTTTAAAAA

Al realizar el alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos (**Cuadro 4**), con el fin de establecer identidad entre ellas, se aprecian regiones conservadas para todas las secuencias y un marcado agrupamiento de las secuencias de la ciudad de Culiacán con respecto a las ciudades de Mazatlán y Los Mochis.

Cuadro 4. Alineamiento de secuencias del gen 16S ARNr, de ~460 pb de garrapatas *R. sanguineus* en caninos de Sinaloa.

Acceso GenBank	Secuencias
RR3Culiacan	----AAACCGACATTCCAGGGT TTGAATAAGA TTTTAATTC GAATGCTAAGAGAA TGGA
RR1Culiacan	-----GNGAATAAGATTTTAATTA GAATGCTAAGAGAA TGGA
RR2Culiacan	-----GATTTTGATTGAATGCTAGGAGAA TGGA
RR4Culiacan	----AAAACAACAAACAAGGT--ATTGAATAAGATTTTAATTA GAATGCTAAGAGAA TGGA
21MNMazatlan	-----TGGGAACACCATATTGAGAA GGAAA TTTAAAAATCATTGAGCACCCCAATTTA
25MAMazatlan	TACGTTGTACGTATTCTTTATGATAGCACCATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCA
C1NHLosMochis	ATTTTCTACGTTTCATTAGCATTTCAATCATTCTTCATTATA TAAAGTCATCCTAATCCA
43HALosMochis	-AATCCCATCTTTCGTAAGACTCT-CCATCGTTCATTATTAAAAAGTATCCTAATCCA
23MAMazatlan	-CTATCTTAACAGCCGCTGCTGCT-TTTTCATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCA
42HNMazatlan	--AATTCATACCAAC TCGATTT-GTTTCATATCTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCA
	* * *** *
RR3Culiacan	AGTT-CCAGAAAAAAC TTTTT TTTAAAT TAAAAATTGAAGT TTTT TTAAT TCTGTGCAG
RR1Culiacan	AGTT-CCAGAAAAAAC TTTTT TTTAA TTTAA -AATTCGAAGTTTT TTTAA TTTGTGCAG
RR2Culiacan	AGTC-CAGA-AAAA-AACTTTT TTTAAAT TAA -AAATGGAAGTTTT TTTAA TTTGTGCAG
RR4Culiacan	AGTC-CAGA-AAAA-AACTTTT TTTAAAT TAA -AAATGGAAGTTTT TTTAA TTTGTGCAG
21MNMazatlan	AAATATCATTGACCACCTTTTT TGTCAATATGATCTA TCAAAAAATATAACGCTGT TATC
25MAMazatlan	ACATCGAGGTCGCAAAC TTTTT TGTCAATATGATCTA TCAAAAAATATAACGCTGT TATC
C1NHLosMochis	ACATCGAGGTCGCAAAC TTTTT TGTCAATATGATCTA TCAAAAAATATAACGCTGT TATC
43HALosMochis	ACATCGAGGTCGCAAAC TTTTT TGTCAATATGATCTA TCAAAAAATATAACGCTGT TATC
23MAMazatlan	ACATCGAGGTCGCAAAC TTTTT TGTCAATATGATCTA TCAAAAAATATAACGCTGT TATC
42HNMazatlan	ACATCGAGGTCGCAAAC TTTTT TGTCAATATGATCTA TCAAAAAATATAACGCTGT TATC
	* **** * * * * * * * *
RR3Culiacan	AAACAAT TATTTATATTAAGACAAGAAGACCCTATGAATTTATTAATTTT TATT TAAT
RR1Culiacan	AAACAAT TATTTATATTAAGACAAGAAGACCCTATGAATTTATTAATTTT TATT TAAT
RR2Culiacan	AAACAAT TATTTATATTAAGACAAGAAGACCCTATGAATTTATTAATTTT TATT TAAT
RR4Culiacan	AAACAAT TATTTATATTAAGACAAGAAGACCCTATGAATTTATTAATTTT TATT TAAT
21MNMazatlan	CCTAGAGTATTTAACATAAAAT CATTAAATAAT GGA-----TCATT TTAT
25MAMazatlan	CCTAGAGTATTTAACATAAAAT CATTAAATAAT GGA-----TCATT TTAT
C1NHLosMochis	CCTAGAGTATTTAACATAAAAT CATTAAATAAT GGA-----TCATT TTAT
43HALosMochis	CCTAGAGTATTTAACATAAAAT CATTAAATAAT GGA-----TCATT TTAT
23MAMazatlan	CCTAGAGTATTTAACATAAAAT CATTAAATAAT GGA-----TCATT TTAT
42HNMazatlan	CCTAGAGTATTTAACATAAAAT CATTAAATAAT GGA-----TCATT TTAT
	* * * * * * * * * * * * * * * *
RR3Culiacan	ATGTAAT TACTA TTAGAAAAAT TTTGGCTGGGGCGGC TAGAAAAAT TTAGAACTT TTTA
RR1Culiacan	ATGTAAT TACTA TTAGAAAAAT TTTGGCTGGGGCGGC TAGAAAAAT TTAGAACTT TTTA
RR2Culiacan	ATGTAAT TACTA TTAGAAAAAT TTTGGCTGGGGCGGC TAGAAAAAT TTAGAACTT TTTA
RR4Culiacan	ATGTAAT TACTA TTAGAAAAAT TTTGGCTGGGGCGGC TAGAAAAAT TTAGAACTT TTTA
21MNMazatlan	TT TTTAAAAAGTT CATAATATTT TCTAGCCGCC CCAGCCAAAA TTTT TCTAA TAGTAATTA
25MAMazatlan	TT TTTAAAAAGTT CATAATATTT TCTAGCCGCC CCAGCCAAAA TTTT TCTAA TAGTAATTA
C1NHLosMochis	TT TTTAAAAAGTT CATAATATTT TCTAGCCGCC CCAGCCAAAA TTTT TCTAA TAGTAATTA

La matriz de porcentaje de identidad de secuencias de Sinaloa (**Cuadro 5**), permite observar entre ellas, identidad variable desde un 41.93% hasta un 95.79% de similitud, con la marcada diferenciación porcentual entre las garrapatas de Culiacán con las de Mazatlán y Los Mochis. Asimismo, se presenta en cada grupo similitudes mayores entre ellas apreciándose 86.71 a 93.21% en el grupo de los Mochis, en Culiacán con identidad de 87.44 a 95.79%, y en Mazatlán la identidad va de 84.01 a 93.29%.

Cuadro 5. Matriz de porcentaje de identidad de secuencias del gen 16S ARNr, de ~460 pb de *R. sanguineus* de caninos en Sinaloa.

	RR3 Culiacán	RR1 Culiacán	RR2 Culiacán	RR4 Culiacán	21MN Mazatlán	25MA Mazatlán	C1NH Los Mochis	43HA Los Mochis	42HN Mazatlán	23MA Mazatlán
RR3 Culiacán	100	90.95	92.08	87.44	44.7	42.82	46.13	44.58	45.39	43.27
RR1 Culiacán	90.95	100	92.33	90.19	43.75	45.23	45.14	45.89	46.46	45.96
RR2 Culiacán	92.08	92.33	100	95.79	41.93	44.24	45.41	45.23	45.01	44.04
RR4 Culiacán	87.44	90.19	95.79	100	44.52	44.73	43.94	43.88	44.19	43.31
21MN Mazatlán	44.7	43.75	41.93	44.52	100	84.01	86.88	87.64	86.65	84.33
25MA Mazatlán	42.82	45.23	44.24	44.73	84.01	100	86.71	89.59	89.57	88.6
C1NH Los Mochis	46.13	45.14	45.41	43.94	86.88	86.71	100	91.42	91.03	88.59
43HA Los Mochis	44.58	45.89	45.23	43.88	87.64	89.59	91.42	100	93.21	90.74
42HN Mazatlán	45.39	46.46	45.01	44.19	86.65	89.57	91.03	93.21	100	93.29
23MA Mazatlán	43.27	45.96	44.04	43.31	84.33	88.6	88.59	90.74	93.29	100

En el filograma de las secuencias de garrapatas *R. sanguineus* en caninos de Sinaloa (**Figura 8**), se aprecia con mayor claridad la tendencia de agrupamiento de las secuencias de Culiacán, separada en otro grupo de secuencias más afines a las cepas Taipéi y los aislados RSJ1, RSCU20, RSTAI17, RSCH15, Bejucal, con respecto a sus contrapartes del estado de Sinaloa que se agrupan con las cepas 12, 40, 5, 7, 17, 2 y 13 la mayoría procedentes de Asia.

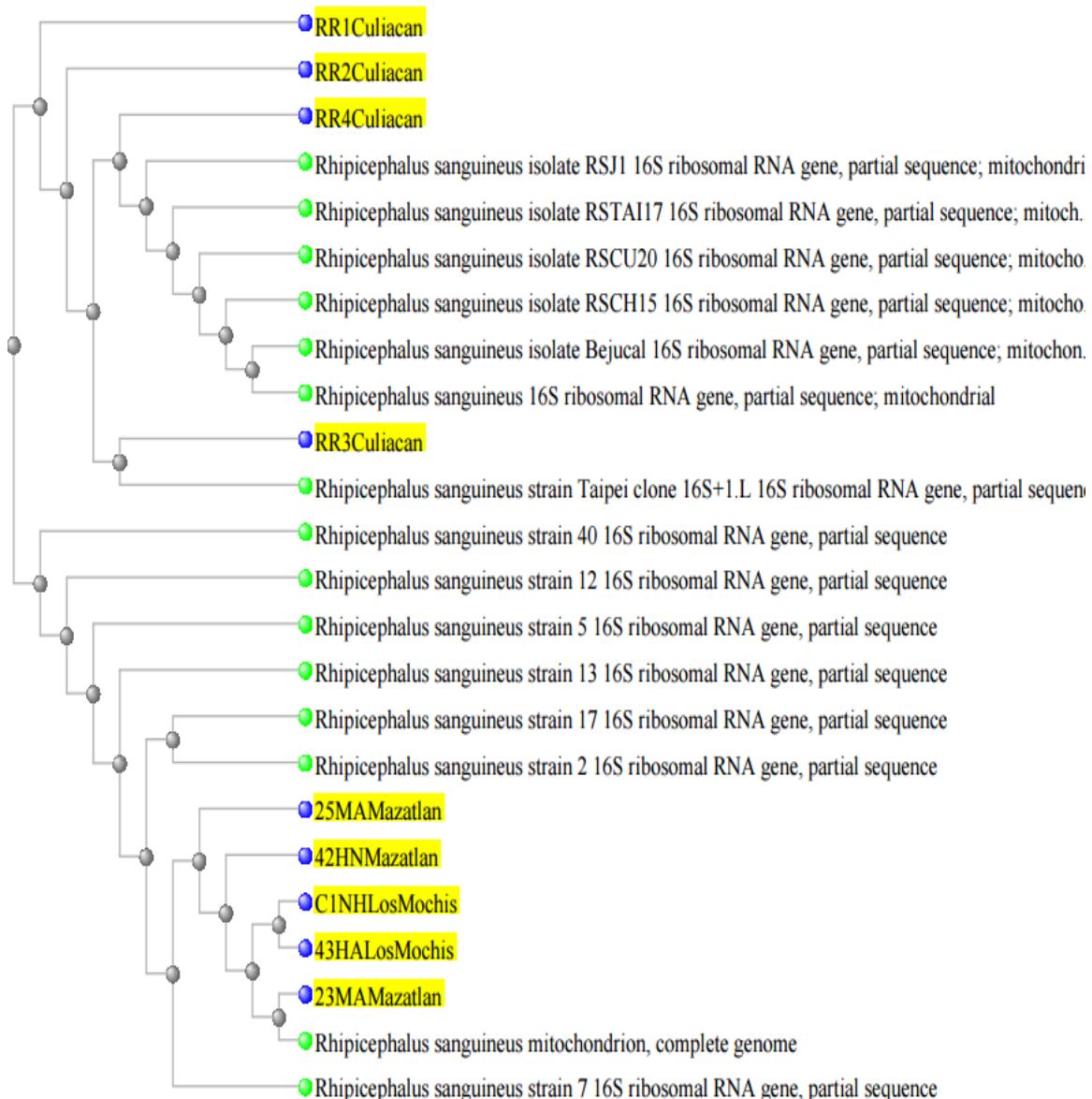


Figura 8. Filogenia de garrapatas *R. sanguineus* en caninos de Sinaloa, comparadas con secuencias en GenBank, mediante sistema de unión de vecinos (*Neighbour-joining tree*, MOLE-BLAST).

Cuadro 6. Alineamiento de Secuencias de Garrapatas *R. sanguineus* Sinaloa, comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank.

Acceso GenBank	Secuencias
21MNMazatlan	TTAAAAATCATTGAGCACCCCAATTTAAAATATCATTGACCACCTTTTTTGTC AATATGA
25MAMazatlan	TC TTCAT TAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883875.1strain17	CTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883880.1strain40	CTTCATTA-AAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883863.1strain2	CTTCATTA-AAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883871strain13	CTTCATTAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883866.1strain5	CTTCATTA-AAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883870.1strain12	CTTCATTA-AAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
Rango	CTTCATTA-AAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
AY883868.1strain7	CTTCATTA-AAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
C1NHLosMochis	TTCA TTTATA TAAAG TCA TCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
43HALosMochis	CA T T CAT TAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
23MAMazatlan	TC TTCAT TAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
42HNMazatlan	TC TTCAT TAAAAAGTATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACTTTTTGTC AATATGA
RR3Culiacan	TT T AAT T C GAA T G C T A A G A G A A T G G A A - G T T C C A G A A A A A A C T T T T T T T A A A T T A A A
RR1Culiacan	TT T AAT T A G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T T C C A G A A A A A A C T T T T T T T A A A T T A A A A
RR2Culiacan	A T T T G A T T G A A T G C T A G G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
DQ093297.1Taipei	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
GU553076.1TropicalC	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
GU553074.1TropicalA	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
JX997391.1RSJ1	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
JX997388RSCU20	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
JX997387.1RSTAI1716S	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
KP830114Bejucal	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
JX997389turanicus	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
KC170744Thai	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
RR4Culiacan	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
GU553075TropicalB	A T T T T A A T T G A A T G C T A A G A G A A T G G A A - G T C C A G A A - A A A - A A C T T T T T T T A A A T T A A A
HM138903Arizona	-TAAACATTG----TTAGTAAATAGAA-ATTACGAA-----AGCAAAAA
HM014443California	-TAAACATTG----TTAGTAAATAGAA-ATTACGAA-----AGCAAAAA
HM012572Mexicali	-TTAACATTG----TAAGTAAATAATA-ATTATGAA-----AGCAAAAA
HM138902Jabotical	-TTAACATTG----TAAGTAAATAATA-ATTATGAA-----AGCAAAAA
AY559842Brazil	-TTAACATTG----TAAGTAAATAATA-ATTATGAA-----AGCAAAAA
	* * *
21MNMazatlan	TC TATCAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
25MAMazatlan	TC TATCAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
AY883875.1strain17	TC TATCAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
AY883880.1strain40	TC TATCAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
AY883863.1strain2	TC TATCAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
AY883871strain13	TC TATCAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----

AY883866.1strain5	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
AY883870.1strain12	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
Rango	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
AY883868.1strain7	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
C1NHLosMochis	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
43HALosMochis	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
23MAMazatlan	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
42HNMazatlan	TC TATCAAAAAAATAAACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTAACATAAAATCATT A -----
RR3Culiacan	AA TTGAAGTTTTTTTAAATCTGTGCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
RR1Culiacan	AT -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
RR2Culiacan	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
DQ093297.1Taipei	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
GU553076.1TropicalC	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
GU553074.1TropicalA	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
JX997391.1RSJ1	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
JX997388RSCU20	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
JX997387.1RSTAI1716S	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
KP830114Bejucal	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
JX997389turanicus	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
KC170744Thai	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
RR4Culiacan	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
GU553075TropicalB	AA -TGAAGTTTTTTTAAATTTGTCAGAAACAAT TATTTATA TTAAGACAAGAAGACCC
HM138903Arizona	AT TATGGCGGTA TTTAAAGCTTTT CAGAGGAA TTGTC -T--CTT TAATGGATAAAACACC
HM014443California	AT TATGGCGGTA TTTAAAGCTTTT CAGAGGAA TTGTC -T--CTT TAATGGATAAAACACC
HM012572Mexicali	AT TATGGCGGTA TTTAAAGCTTTT CAGAGGAA TTGTC -T--CTT TAATGGATAAAACACC
HM138902Jabotical	AT TATGGCGGTA TTTAAAGCTTTT CAGAGGAA TTGTC -T--CTT TAATGGATAAAACACC
AY559842Brazil	AT TATGGCGGTA TTTAAAGCTTTT CAGAGGAA TTGTC -T--CTT TAATGGATAAAACACC
	* * * * *
21MNMazatlan	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
25MAMazatlan	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883875.1strain17	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883880.1strain40	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883863.1strain2	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883871strain13	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883866.1strain5	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883870.1strain12	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
Rango	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
AY883868.1strain7	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
C1NHLosMochis	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
43HALosMochis	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
23MAMazatlan	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
42HNMazatlan	--ATAA- TGGATCATTTTATTTTAAAAAGTT CATAA TATTTCTAGCCGCCCCAGCCAA
RR3Culiacan	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAAT TAC TAT -----TAGAAAA

RR1Culiacan	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
RR2Culiacan	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
DQ093297.1Taipei	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
GU553076.1TropicalC	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
GU553074.1TropicalA	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
JX997391.1RSJ1	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
JX997388RSCU20	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
JX997387.1RSTAI1716S	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
KP830114Bejuca1	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
JX997389turanicus	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
KC170744Thai	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
RR4Culiacan	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
GU553075TropicalB	TATGAATTTATTAATTTTATTTAATATGTAATTACTAT-----TAGAAAA
HM138903Arizona	TAAATCTTACTTAAATTGTAAATCAATTTGTAACCAC-----TATAAAA
HM014443California	TAAATCTTACTTAAATTGTAAATCAATTTGTAACCAC-----TATAAAA
HM012572Mexicali	AAAACTTACTTAGATTGTGATTTCAATTTGTAACCAC-----TATTAAA
HM138902Jabotical	AAAACTTACTTAGATTGTGATTTCAATTTGTAACCAC-----TATTAAA
AY559842Brazil	AAAACTTACTTAGATTGTGATTTCAATTTGTAACCAC-----TATTAAA
	* * * * * * * * * * * * * * *
21MNMazatlan	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
25MAMazatlan	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATAAA-AATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883875.1strain17	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883880.1strain40	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883863.1strain2	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883871strain13	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883866.1strain5	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883870.1strain12	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
Rango	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
AY883868.1strain7	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
C1NHLosMochis	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
43HALosMochis	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
23MAMazatlan	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
42HNMazatlan	AAATTTTCTAATAGTAAATTACATATTAATAAAAAATTAAATAAATTCATA----GGGTCT
RR3Culiacan	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
RR1Culiacan	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
RR2Culiacan	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
DQ093297.1Taipei	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
GU553076.1TropicalC	ATTTTGGCTGGGCGGT TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
GU553074.1TropicalA	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TAAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
JX997391.1RSJ1	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TAAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
JX997388RSCU20	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
JX997387.1RSTAI1716S	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT
KP830114Bejuca1	ATTTTGGCTGGGCGGC TAGAAAA TATTA TGAAC TTTTAAAAATAAAA TGATCCATTAT

JX997389	turanicus	ATTTGGCTGGGCGGC	TAGAAAA	TATTA	TGAAC	TTTT	TAAAA	TAAAA	TGATCC	ATTAT			
KC170744	Thai	ATTTGGCTGGGCGGC	TAGAAAA	TATTA	TGAAC	TTTT	TAAAA	TAAAA	TGATCC	ATTAT			
RR4	Culiacan	ATTTGGCTGGGCGGC	TAGAAAA	TATTA	TGAAC	TTTT	TAAAA	TAAAA	TGATCC	ATTAT			
GU553075	TropicalB	ATTTGGCTGGGCGGC	TAGAAAA	TATTA	TGA	ACT	TTTT	TAAAA	TAAAA	TGATCC	ATTAT		
HM138903	Arizona	ACAATTAATAAC	TTCAAT	-----	TGTTAAA	ATT	TATAAA	TTAAGT	----	TATAT			
HM014443	California	ACAATTAATAAC	TTCAAT	-----	TGTTAAA	ATT	TATAAA	TTAAGT	----	TATAT			
HM012572	Mexicali	ACAATTTATAAC	TTTAA	-----	TGTTTAA	ATT	TACAAA	ACTAAAA	----	TATAT			
HM138902	Jabotical	ACAATTTATAAC	TTTAA	-----	TGTTTAA	ATT	TACAAA	ACTAAAA	----	TATAT			
AY559842	Brazil	ACAATTTATAAC	TTTAA	-----	TGTTTAA	ATT	TACAAA	ACTAAAA	----	TATAT			
		*	*	*	*	*	*	*	*	*			
21MN	Mazatlan	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
25MA	Mazatlan	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883875	.1strain17	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883880	.1strain40	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883863	.1strain2	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883871	strain13	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883866	.1strain5	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883870	.1strain12	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
	Rango	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
AY883868	.1strain7	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
C1NH	LosMochis	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
43HA	LosMochis	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
23MA	Mazatlan	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
42HN	Mazatlan	TC	TTGTC	TTTAA	TATAAA	AAT	TGTTT	CTGC	CAAA	TAAAA	AACTT	CAATTT	TTAAT
RR3	Culiacan	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
RR1	Culiacan	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
RR2	Culiacan	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
DQ093297	.1Taipei	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
GU553076	.1TropicalC	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
GU553074	.1TropicalA	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
JX997391	.1RSJ1	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
JX997388	RSCU20	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
JX997387	.1RSTAI1716S	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
KP830114	Bejucal	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
JX997389	turanicus	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
KC170744	Thai	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
RR4	Culiacan	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
GU553075	TropicalB	TAAT	GATTT	TATGT	TAA	ACT	CTAGG	GATA	CAGCG	TTATA	TT	-----	TTT
HM138903	Arizona	AA	GTCA	AGGTGC	AGTAAAA	ATT	TAAGA	ATGA	AGTGAA	TTACA	TTTC	-----	TTT
HM014443	California	AA	GTCA	AGGTGC	AGTAAAA	ATT	TAAGA	ATGA	AGTGAA	TTACA	TTTC	-----	TTT
HM012572	Mexicali	AA	GTCA	AGGTGC	AGTAAAA	ATT	TAAGG	ATGA	AGTGAA	TTACA	TTAC	-----	TTT
HM138902	Jabotical	AA	GTCA	AGGTGC	AGTAAAA	ATT	TAAGG	ATGA	AGTGAA	TTACA	TTAC	-----	TTT
AY559842	Brazil	AA	GTCA	AGGTGC	AGTAAAA	ATT	TAAGG	ATGA	AGTGAA	TTACA	TTAC	-----	TTT

```

                *      *      **** * *      *      * *      ***
21MNMazatlan      TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
25MAMazatlan      TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883875.1strain17 TAAAAAAARKTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883880.1strain40 TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883863.1strain2  TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883871strain13  TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883866.1strain5  TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883870.1strain12 TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
Rango              TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
AY883868.1strain7  TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
C1NHLosMochis     TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
43HALosMochis     TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
23MAMazatlan      TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
42HNMazatlan      TAAAAAAAGTTTTTTC TGGAC TTCATTCTC TTAGCAT TCAAT TAAAA TC TTA TTTCAA
RR3Culiacan       --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
RR1Culiacan       --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
RR2Culiacan       --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
DQ093297.1Taipei  --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
GU553076.1TropicalC --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
GU553074.1TropicalA --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
JX997391.1RSJ1    --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
JX997388RSCU20   --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
JX997387.1RSTAI1716S --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
KP830114Bejucal  --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
JX997389turanicus --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
KC170744Thai     --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
RR4Culiacan       --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
GU553075TropicalB --TAGATCATATGACAAAAAAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACCTTTTAA
HM138903Arizona   --GAGAG-AAATTTAA-ATAACATTTAGGAT-----
HM014443California --GAGAG-AAATTTAA-ATAACATTTAGGATTGAAAGTAAAATGAAATA-----
HM012572Mexicali  --GAGAT-AAGTTTATAACAATATTTAGGAT-----
HM138902Jabotical --GAGAT-AAGTTTATAACAATATTTAGGAT-----
AY559842Brazil    --GAGAT-AAGTTTATAACAATATTTAGGATTGAAAGTAAAATTAAATA-----

```

- (guion) gap de deleción, * (asterisco) Identidad entre columnas,

En el alineamiento múltiple de secuencias de garrapatas *R. sanguineus* de Sinaloa con las del GenBank (**Cuadro 6**), se observan regiones conservadas para todas las secuencias, así como el agrupamiento de tres grandes bloques similares entre sí; mismos que se aprecian claramente en la matriz de porcentaje de identidad

entre secuencias del GenBank y Sinaloa (**Cuadro 7**); en el primer bloque se ubican las secuencias de Mazatlán y Los Mochis con identidad que van desde 84.46 al 100%; un segundo bloque que contiene las secuencias del grupo de Culiacán con identidades de 89.41 a 100% y un tercer bloque en el que se ubican las secuencias de Arizona, California, Mexicali y Brasil con identidad de 90.46 a 100%.

Asímismo en esta matriz de identidad de secuencias de *R. sanguineus* de caninos en Sinaloa comparados con secuencias del GenBank (**Cuadro 7**), se puede observar al grupo de Culiacán con identidad del 100% a *R. sanguineus Tropical B* (GenBank GU553075) la cual de acuerdo con Moraes-Filho *et al.* (2011), es el haplotipo que se presenta mayormente en América Latina; también presenta 99.72% de identidad con *R. sanguineus Tropical A* (GenBank GU553074) y *Tropical C* (GenBank GU553076), que junto con el haplotipo *Tropical B*, se encuentran distribuidas desde el noreste de México hasta el noreste de Brasil representado por poblaciones de garrapatas tropicales y subtropicales, siendo designadas como especies tropicales. El grupo Culiacán también presenta una identidad del 98.97% con *R. sanguineus taipei* (GenBank DQ093297), 98.60% con *R. sanguineus Jaboticabal Brasil* (GenBank JX997391); 98.25% con *R. sanguineus thai* (GenBank JX997387) y 98.24% con *R. sanguineus Cuba* (GenBank JX997388). Por otra parte los grupos de secuencias de Mazatlán y Los Mochis reflejan mayor semejanza con garrapatas asiáticas de Taiwán e Isla Kinmen al presentar la mayor identidad del 93.47% con la cepa 13 (GenBank AY883871), 93.46% con las cepas 2 (GenBank AY883863), 7 (GenBank AY883868) y 12 (GenBank AY883870), 93.44% con cepa 40 (GenBank AY883880) y 93.19% con la cepa 5 (GenBank AY883866).

Con respecto al tercer bloque que abarca secuencias de Arizona, California, Mexicali y Brasil, se aprecia mayor identidad entre las secuencias de Arizona y California, y a su vez la de Mexicali con las de Brasil, así mismo se diferencia a estas con las *R. sanguineus* de Sinaloa, sugiriendo que estas pertenecen a otro clado, tal y como se observaron en la matriz de identidad y los cladogramas de las secuencias de Sinaloa comparadas con el Genbank.

Cuadro 7. Matriz de porcentaje de identidad de secuencias de *R. sanguineus* de caninos en Sinaloa comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33				
1: 21NMZatlán	100	84.4	86.8	89.4	89.4	89.2	89.2	89.2	88.3	89.4	87	87.6	85	87	45.2	43.7	42.4	44	43.9	44.2	43.8	43.3	43.4	43.5	43.9	43.7	45.1	43.9	44.4	44	44.3	44.3	44.7				
2: 25MAZatlán	84.4	100	87	90.3	90.4	90.4	90.1	90.1	90.1	90.4	86.7	89.7	88.8	90.5	42.4	45.3	44.4	45.7	46.1	46.4	45.4	45.3	45.3	44.3	44.8	44.3	45.8	46.1	42.9	43	43.9	43.9	43.8				
3: AY883875.1strain17	86.8	87	100	96.7	96.7	96.8	96.5	96.5	96.5	96.7	89.6	89.1	89.1	90.1	45.7	43.5	44	43.5	44.1	44.4	44	43.7	43.7	42.9	42.8	42.9	43.6	44.1	43.4	43.9	43.3	43.3	43.8				
4: AY883880.1strain40	89.4	90.3	96.7	100	100	100	99.8	99.8	99.8	100	91.7	92.4	92.4	93.4	47.4	44.9	45.8	45.3	45.9	46.2	45.7	45.4	45.4	44.4	44.4	44.4	45.3	45.9	44.1	44.6	45.1	45.1	45.4				
5: AY883863.1strain2	89.4	90.4	96.7	100	100	100	99.8	99.8	99.8	100	91.7	92.4	92.4	93.5	47.1	44.6	45.5	45	45.6	45.9	45.4	45.1	45.1	44.2	44.2	44.2	45.1	45.6	43.8	44.3	44.7	44.7	45.1				
6: AY883871strain13	89.2	90.4	96.8	100	100	100	99.8	99.8	99.8	100	91.7	92.5	92.5	93.5	47.1	44.9	45.5	45	45.6	45.9	45.4	45.1	45.1	44.2	44.2	44.2	45.1	45.6	43.8	44.3	44.7	44.7	45.1				
7: AY883866.1strain5	89.2	90.1	96.5	99.8	99.8	99.8	100	99.5	99.5	99.8	91.4	92.2	92.2	93.2	47.3	44.8	45.7	45.2	45.7	46	45.6	45.3	45.3	44.3	44.3	44.3	45.2	45.7	44	44.4	44.9	44.9	45.3				
8: AY883870.1strain12	89.2	90.1	96.5	99.8	99.8	99.8	99.5	100	99.5	99.8	92	92.7	92.7	93.5	47.6	44.8	45.7	45.2	45.7	46	45.6	45.3	45.3	44.3	44.3	44.3	45.2	45.7	44	44.4	44.9	44.9	45.3				
9: Rango	88.3	90.1	96.5	99.8	99.8	99.8	99.5	99.5	100	99.8	90.4	91.1	91.5	92.2	46.9	44.6	45.4	45	45.5	45.8	45.3	45.1	45.1	44.4	44.2	44.4	45	45.5	44.3	44.4	45.3	45.3	45.4				
10: AY883868.1strain7	89.4	90.4	96.7	100	100	100	99.8	99.8	99.8	100	91.7	92.4	92.4	93.5	47.3	44.8	45.7	45.2	45.7	46	45.6	45.3	45.3	44.3	44.3	44.3	45.2	45.7	44	44.4	44.9	44.9	45.3				
11: C1NHLosMochis	87	86.7	89.6	91.7	91.7	91.7	91.4	92	90.4	91.7	100	91.4	88.6	91	46.4	44.2	45.2	45.4	45.4	45.7	44.8	44.7	44.4	44.6	44.4	44.3	43.8	45.4	43.5	43.2	44.1	44.1	44				
12: 43HALosMochis	87.6	89.7	89.1	92.4	92.4	92.5	92.2	92.7	91.1	92.4	91.4	100	90.7	93.2	45.6	45.1	45.3	45.6	45.4	45.7	45.2	45	44.8	43.6	43.9	43.9	44.5	45.4	42.9	43	43.9	43.9	44.1				
13: 23MAZatlán	85	88.8	89.1	92.4	92.4	92.5	92.2	92.7	91.5	92.4	88.6	90.7	100	93.3	43.3	44.6	43.7	45.4	45.7	46	44.7	44.5	44.3	42.8	43.2	43	43.5	45.7	42.9	42.7	43.9	43.9	43.5				
14: 42HNZatlán	87	90.5	90.1	93.4	93.5	93.5	93.2	93.5	92.2	93.5	91	93.2	93.3	100	45.3	45.2	44.5	45.4	45.7	46	45.4	45.3	45.1	43.6	43.8	43.8	43.8	45.7	42.9	42.7	43.9	43.9	43.8				
15: RR3Culiacán	45.2	42.4	45.7	47.4	47.1	47.1	47.3	47.6	46.9	47.3	46.4	45.6	43.3	45.3	100	90.7	92.3	93.6	93.6	93.6	93	93.2	93	89.4	90.6	89.7	86.1	93.9	52.6	50.9	50.9	50.9	49.6				
16: RR1Culiacán	43.7	45.3	43.5	44.9	44.6	44.9	44.8	44.8	44.6	44.8	44.2	45.1	44.6	45.2	90.7	100	92.3	95.6	94.4	94.4	94.4	94.6	94.7	92.1	94.4	92.4	90.2	94.7	54	51.4	52.3	52.3	50.3				
17: RR2Culiacán	42.4	44.4	44	45.8	45.5	45.5	45.7	45.7	45.4	45.7	45.2	45.3	43.7	44.5	92.3	92.3	100	99.5	99.2	99.2	99.2	99.5	99.5	97.5	99.2	97.7	95.8	99.4	53.6	51.7	52.3	52.3	51				
18: DQ093297.1Taipei	44	45.7	43.5	45.3	45	45	45.2	45.2	45	45.2	45.4	45.6	45.4	45.4	93.6	95.6	99.5	100	98.9	98.9	99	99.2	99.2	99	99.2	99.2	99	99.2	99.2	99	99.2	54	52.2	52.6	52.6	52	
19: GU553076TropicalC	43.9	46.1	44.1	45.9	45.6	45.6	45.7	45.7	45.5	45.7	45.4	45.4	45.7	45.7	93.6	94.4	99.2	98.9	100	99.4	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	54	53.4	52.6	52.6	53.2	
20: GU553074TropicalA	44.2	46.4	44.4	46.2	45.9	45.9	46	46	45.8	46	45.7	45.7	46	46	93.6	94.4	99.2	98.9	99.4	100	100	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	54	53.4	52.6	52.6	53.2
21: JX997391.1RSJ1	43.8	45.4	44	45.7	45.4	45.4	45.6	45.6	45.3	45.6	44.8	45.2	44.7	45.4	93	94.4	99.2	99	99.4	100	100	99.8	99.8	99.5	99.8	99.8	98	99.7	99.7	99.7	99.7	54	52.2	52.6	52.6	52	
22: JX997388RSCU20	43.3	45.3	43.7	45.4	45.1	45.1	45.3	45.3	45.1	45.3	44.7	45	44.5	45.3	93.2	94.6	99.5	99.2	99.7	99.7	99.8	100	100	99.8	100	100	98.2	100	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	
23: JX997387RSTA17	43.4	45.3	43.7	45.4	45.1	45.1	45.3	45.3	45.1	45.3	44.4	44.8	44.3	45.1	93	94.7	99.5	99.2	99.7	99.7	99.8	100	100	99.8	100	100	98.3	100	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	
24: KP830114Bejucal	43.5	44.3	42.9	44.4	44.2	44.2	44.3	44.3	44.4	44.3	44.6	43.6	42.8	43.6	99.4	92.1	97.5	99	99.7	99.7	99.5	99.8	99.8	100	99.8	99.8	99.8	94.1	100	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	
25: JX997389Turanicus	43.9	44.8	42.8	44.4	44.2	44.2	44.3	44.3	44.2	44.3	44.4	43.9	43.2	43.8	90.6	94.4	99.2	99.2	99.7	99.7	99.8	100	100	99.8	100	100	96.4	100	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	
26: KC170744Thai	43.7	44.3	42.9	44.4	44.2	44.2	44.3	44.3	44.4	44.3	44.3	43.9	43	43.8	99.7	92.4	97.7	99.2	99.7	99.7	99.8	100	100	99.8	100	100	94.3	100	94.3	94.3	94.3	94.3	94.3	94.3	94.3	94.3	
27: RR4Culiacán	45.1	45.8	43.6	45.3	45.1	45.1	45.2	45.2	45	45.2	43.8	44.5	43.5	43.8	96.1	90.2	95.8	99	99.7	99.7	98	98.2	98.3	94.1	96.4	94.3	100	100	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4	96.4		
28: GU553075TropicalB	43.9	46.1	44.1	45.9	45.6	45.6	45.7	45.7	45.5	45.7	45.4	45.4	45.7	45.7	93.9	94.7	99.4	99.2	99.7	99.7	99.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
29: HM138903Arizona	44.4	42.9	43.4	44.1	43.8	43.8	44	44	44.3	44	43.5	42.9	42.9	42.9	52.6	54	53.6	54	54	54	54	54	54	54	54	53.1	54	54	54	54	100	100	90.5	90.5	90.1		
30: HM014443California	44	43	43.9	44.6	44.3	44.3	44.4	44.4	44.4	44.4	43.2	43	42.7	42.7	50.9	51.4	51.7	52.2	53.4	53.4	52.2	52.2	52.2	52.3	51.5	52.3	51.7	53.4	100	100	90.5	90.5	90.8				
31: HM012572Mexicali	44.3	43.9	43.3	45.1	44.7	44.7	44.9	44.9	45.3	44.9	44.1	43.9	43.9	43.9	50.9	52.3	52.3	52.6	52.6	52.6	52.6	52.6	52.6	52.6	52.7	51.8	52.7	52.6	52.6	90.5	90.5	100	100	99.7			
32: HM138902Jabotical	44.3	43.9	43.3	45.1	44.7	44.7	44.9	44.9	45.3	44.9	44.1	43.9	43.9	43.9	50.9	52.3	52.3	52.6	52.6	52.6	52.6	52.6	52.6	52.6	52.7	51.8	52.7	52.6	52.6	90.5	90.5	100	100	99.7			
33: AY559842Brazil	44.7	43.8	43.8	45.4	45.1	45.1	45.3	45.3	45.4	45.3	44	44.1	43.5	43.8	49.6	50.3	51	52	53.2	53.2	52	52	52	52.3	51.7	52.3	50.9	53.2	90.1	90.8	99.7	99.7	100				

Lo anterior concuerda con Sánchez (2013), quien observó que las secuencias de fragmentos del gen 12S y del 16S ADNr muestran la misma topología de los árboles filogenéticos, donde se aprecian dos grupos muy fuertes, uno compuesto de *R. sanguineus* en Jaboticabal (Brasil), Colombia, regiones tropicales de Argentina, Perú, Paraguay, México, Guatemala, la isla de San Cristóbal (Panama), Cuba, Taiwán (China), Tailandia, Sudáfrica y Mozambique dentro del cual se sitúan las garrapatas de Sinaloa y el otro grupo formado por *R. sanguineus* en Europa (Francia, España, Suiza, Portugal), las regiones templadas de Argentina, Uruguay, Israel y Estados Unidos.

Otro aspecto sobre la importancia de las garrapatas *R. sanguineus*, es la competencia vectorial entre las distintas especies del complejo *R. sanguineus* para transmitir patógenos. En ese sentido, la evaluación de la infección con *Rickettsia* y *Ehrlichia* en condiciones naturales sugieren una diferencia, en dicho comportamiento, aunque no existe suficiente evidencia. Moraes-Filho *et al.* (2012) en un estudio experimental, para *Ehrlichia canis* en cuatro poblaciones neotropicales de garrapatas *R. sanguineus*, encontraron que las garrapatas de América tropical (Sao Paulo, Brasil) eran vectores competentes de *E. canis*, pero no las garrapatas *R. sanguineus* del Cono Sur de América del Sur, abarcando Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Río Grande del Sur) lo cual concuerda con Venzal *et al.* (2007), quienes en la búsqueda de ADN ehrlichial extraído de garrapatas de perros estudiados en las zonas urbanas y suburbanas de Uruguay (36 pooles de 180 garrapatas) no encontraron infección de *Ehrlichia spp* asegurando que *R. sanguineus* se ha incriminado como vector de estos patógenos. Por el contrario, las garrapatas *R. sanguineus* colectadas en localidades de Brasil (Estados de Bahía y Rondonia) se encontraron naturalmente infectados con *E. canis* (Aguiar *et al.*, 2007; Da Silva Souza *et al.*, 2010). Esta diferencia en la competencia vectorial de los linajes de *R. sanguineus*, expresada por *E. canis*, también podría ocurrir para otros patógenos. La determinación de este tema es relevante para entender la epidemiología de las enfermedades en las que están implicados los linajes neotropicales de *R. sanguineus* (Nava *et al.*, 2012).

Como no se resuelven las relaciones entre los linajes y con base en estos datos, es difícil establecer si las garrapatas de Mazatlán y Los Mochis Sinaloa, pertenecen a una especie del complejo *R. sanguineus* aún no descrito (Beati y Keirans 2001; Szabo *et al.*, 2005; Burlini *et al.*, 2010) por lo que es necesario profundizar en estudios genéticos específicos que permitan una reevaluación a fondo de la situación taxonómica de las garrapatas del complejo *R. sanguineus*. esto permitiría comprender mejor su papel en la transmisión de patógenos a los seres humanos y los animales (Eremeeva *et al.*, 2011), cuyas enfermedades son reconocidas como infecciones emergentes que amenazan tanto a humanos como a los caninos (Chomel, 2011).

Tomando en cuenta que el potencial zoonótico de las garrapatas está determinado principalmente por la dinámica poblacional que contempla su variación espacial y temporal, influenciada tanto por factores abióticos (climáticos) que actúan sobre sus estados de vida libre y factores bióticos (hospedero) responsables de que actúen como parásito (Randolph, 2004); esto está asociado con la gran movilidad de la población humana y sus animales de compañía, combinado con los cambios en los ecosistemas favorables para la sobrevivencia de los ectoparásitos (Beugnet y Marie, 2009) y la facilidad que poseen estos artrópodos de adaptarse a las diferentes condiciones climatológicas (Dantas-Torres, 2010); también tiene relación con la cada vez más estrecha convivencia entre perros y humanos. Por lo anterior se considera relevante el estudio de identificación morfológica y genética de esta garrapata, con énfasis como vector y/o hospedero reservorio de agentes patógenos y predecir el riesgo que estas pueden tener sobre la salud humana y canina. La información generada permitirá a las autoridades de salud pública implementar acciones preventivas de educación sanitaria y medidas de control en programas de salud pública y animal a fin de evitar su propagación y con ello ayudar a disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas.

CAPÍTULO 3. *Rickettsia rickettsii* EN SANGRE Y GARRAPATAS DE CANINOS DOMESTICOS DE SINALOA, MÉXICO.

3.1 INTRODUCCIÓN

Rickettsia rickettsii descrita por Wolbach en 1919 (Saito *et al.*, 2008), es el agente causal de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR). Es transmitida por garrapatas, principalmente *Rhipicephalus sanguineus* que propagan la enfermedad al canino, quien además de padecerla puede actuar como reservorio (Clark *et al.*, 2015; Estripeaut *et al.*, 2007; López *et al.*, 2007), y transmitirla a otros hospedero incluidos los humanos (Cunha *et al.*, 2009). Esta situación se genera por la estrecha relación de convivencia que se da entre ambos, y sobre todo a que *R. sanguineus* es una garrapata perfectamente adaptada al ambiente doméstico (Parola y Raoult, 2001). *R. rickettsii* afecta mayormente a menores de 15 años, comúnmente a niños de 5 a 9 años de edad (Álvarez-Hernández y Contreras, 2013; Buckingham, 2007); y adultos de 40 a 64 años (McNabb *et al.*, 2007). Los factores asociados con la adquisición de la enfermedad se focalizan principalmente, en las condiciones de higiene de las viviendas y la convivencia con caninos infestados con garrapatas infectadas (SINAVE 2010).

En México existen antecedentes de FMMR en humanos desde 1944, en el sur de Sonora y norte de Sinaloa, principalmente en los municipios de Choix y el Fuerte, razón por la que se denominó “Fiebre de Choix” o “Fiebre manchada” registrándose 150 casos y 93 defunciones (Bustamante y Varela, 1944); en 2009-2011 se notificaron en todo México 2,616 casos con una tasa de incidencia de 0.8 por 100 mil habitantes (SINAVE, 2012).

La letalidad de FMMR; se ha asociado con el inóculo y virulencia de la cepa de *R. rickettsii*, con patrones de alimentación de la garrapata transmisora, con variaciones geográficas y con la edad, sexo y otros factores biológicos del hospedero (Chen y Sexton, 2008; Dantas-Torres, 2007), y principalmente con el retraso de la atención médica (mayor a cinco días del inicio de manifestaciones clínicas), la pobre oportunidad diagnóstica y el comienzo del tratamiento adecuado (Buckingham *et al.*, 2007; Childs y Paddock, 2002). De acuerdo con Álvarez-Hernández y Contreras (2013), el desconocimiento de la enfermedad por el personal médico contribuye de

modo decisivo en la ocurrencia de casos severos ya que en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) desde el año 2004 se han registrado 121 casos de FMRR y 35 de esos niños fallecieron, el 90% recibió al menos dos consultas médicas previas, y a 3 de cada 4 pacientes se les diagnosticó y trató como una faringitis aguda infecciosa; también se debe considerar que los pacientes son referidos en condiciones de extrema gravedad y con inestabilidad hemodinámica y metabólica, por lo que la muerte del menor puede ocurrir tras únicamente 1.6 días de estancia hospitalaria y con sólo dos dosis de tratamiento adecuado, sin oportunidad suficiente para la acción farmacológica del antibiótico ni respuesta a las medidas de soporte respiratorio y aminérgico. La letalidad por FMMR en pacientes pediátricos atendidos en el HIES es mayor a cualquier otro padecimiento infeccioso de interés epidemiológico como tosferina, influenza A H1N1, tuberculosis, neumonías y diarrea infecciosa.

Estos y otros indicadores epidemiológicos pueden estar subvalorados debido al sub-registro de la enfermedad en países endémicos. Las causas de este sub-registro pueden ser las fallas en los procesos formativos de médicos y personal de salud asociado; la presentación inespecífica de la enfermedad que dificulta su diagnóstico clínico; las fallas en el registro de picaduras y exposición a garrapatas, que ayudaría a iniciar terapias empíricas con doxiciclina; la falta de infraestructura y acceso en el diagnóstico por laboratorio y la baja sensibilidad de algunas técnicas diagnósticas durante la fase aguda; y la falta de investigadores y personal que trabaje en aspectos básicos y aplicados de la Rickettsiología (Álvarez-Hernández y Contreras, 2013; Dumler y Walker, 2005; Walker, 2002). La falta de conocimientos sobre la enfermedad del personal médico es crucial y debe ser motivo de estrategias educativas efectivas para disminuir el negativo impacto que provoca, ya que se ha documentado que sólo 1 de cada 4 médicos identifican correctamente al padecimiento e inician el tratamiento adecuado (O'Reilly *et al.*, 2003).

Por lo anteriormente mencionado el objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar genéticamente *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas de caninos domésticos que son atendidos en las diferentes clínicas veterinarias de las ciudades de Los Mochis, Culiacán y Mazatlán del estado de Sinaloa.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Muestras: se consideraron 320 caninos atendidos en clínicas veterinarias de las ciudades de los Mochis, Culiacán y Mazatlán, mediante “selección intencionada o muestreo por conveniencia”, técnica de muestreo no probabilístico descrita por Thrusfield (2005), la colección de las muestras se realizó durante el año, con énfasis en los meses considerados de mayor prevalencia de garrapatas (marzo-septiembre).

3.2.2. Criterios de Inclusión: se incluyeron caninos atendidos en los lugares mencionados, con presencia de garrapata, de cualquier raza, sexo y edad.

3.2.3. Criterios de exclusión: se rechazaron muestras de sangre hemolizadas, conservadas a temperatura ambiente, en tubo o envase roto, así como las muestras sin etiqueta o rótulo de identificación, sin fecha o datos incompletos.

3.2.4. Colecta y procesamiento de muestras: se obtuvieron 320 muestras de sangre completa (5 mL), extraída por punción de la vena cefálica de la extremidad anterior o de la vena safena de la extremidad posterior y/o de la yugular de cada canino, depositadas en tubos Vacutainer® con EDTA, y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento; a su vez se retiraron 642 garrapatas de los caninos mediante el procedimiento descrito por Needham (1985), y Gammons y Salam (2002), conservándolas a -20°C en tubos eppendorf de 1.5 mL (Parola y Raoult, 2001), las cuales posteriormente se identificaron con base en las claves morfológicas del manual de identificación taxonómica de garrapatas (DGSA, 2004), y con la clave pictórica (Benavides y López, 2005), observándose en microscopio estereoscópico las estructuras de: capitulum (base del capituli, palpos, hypostoma), apertura genital, placa espiracular, surco anal, placa adanal 1ra coxa (espolones internos y externos), 4ta coxa, escudo dorsal y festones (**Figura 5**); la clasificación se realizó teniendo en cuenta procedencia y hospedero, género, especie, estadio evolutivo (larva, ninfa y adulto) y sexo (hembra y macho adulto), con estos datos se generaron 64 lotes de garrapatas (**Cuadro 2**). Todas las muestras de sangre y garrapatas fueron procesadas en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria

y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Boulevard San Ángel S/N, Fraccionamiento San Benito, Predio Las Coloradas, Culiacán, Sinaloa, México.

3.2.5. Extracción de ADN de muestras: el ADN de las muestras de garrapatas, previa maceración, se extrajo con el QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN® (Macrogen Corp. Rockville, MD 20850 USA), acorde a las indicaciones del fabricante y la extracción de ADN de las muestras de sangre canina se realizó por la técnica de fenol-cloroformo, con 300 µL de sangre completa de caninos, la cual se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregó amortiguador de lisis (TE: tris 100 mM y EDTA 10 mM), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 20%, se incubaron a 37°C en calor seco con agitación y luego a 56°C en calor húmedo, durante 1 h en cada condición; después, se agregó fenol (1:1), seguida de una centrifugación a 12,000 revoluciones por minuto (RPM) por 2 min, se obtuvo el sobrenadante y se añadió cloroformo (1:1), de nuevo se centrifugó por 2 min a 12,000 RPM, se obtuvo el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol, se refrigeró a -20°C durante 2 h, se centrifugó por 15 min a 12,000 RPM, se decantó el sobrenadante, se secó en campana de extracción, y se agregó 50 µL de agua inyectable estéril a cada muestra. La pureza de cada muestra de ADN se verificó a partir de 5 µL de la muestra, se homogenizó con 2 µL de azul de bromo fenol, se colocó en gel de agarosa al 2% teñido con Gelred® (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA), y sometido a una diferencia de potencial por medio de una cámara de electroforesis a 80 volts, 250 mA durante 30 min observado con luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): la amplificación del ADN obtenido, se realizó por PCR, inicialmente preparando una mezcla de reacción a un volumen de 25 µL (Buffer 5X, MgCl₂, dNTPs, H₂O inyectable estéril, Taq polimerasa, oligonucleótidos y ADN). La reacción se llevó a cabo en un termociclador BioRad® multigene T100 (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA) para la amplificación del fragmento de ~401 pb del gen *gltA* el cual codifica para la enzima citrato sintasa (presente en todas las rickettsias) que cataliza el primer paso del ciclo

del ácido tricarbóxico (ciclo del ácido cítrico), cataliza la reacción del oxalacetato y del acetil Coenzima A para formar citrato y coenzima A y participa en la generación de una variedad de intermediarios celulares biosintéticos y en la generación de nucleótidos de purina reducidos, usados en la generación de energía vía reacciones de fosforilación ligadas a transporte de electrones (Roux *et al.*, 1997). Las secuencias de oligonucleótidos del género *Rickettsia*: CS-78: 5'-GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT-3' y CS-323: 5'-GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T-3' (Oteo *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2011; Labruna *et al.*, 2004), se utilizaron bajo las condiciones de reacción adaptadas de Oteo *et al.* (2014) e incluyeron un primer paso de desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 15 s, 55°C durante 30 s para alineamiento y 72°C por 30 s para extensión y un paso final de extensión final a 72°C por 8 min.

3.2.7. Purificación: los productos amplificados se purificaron a través de columnas QIAquick Gel Extraction kit (QUIAGEN®, Macrogen Corp. Rockville, MD 20850 USA) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante

3.2.8. Visualización de ADN amplificado y purificado: los productos de amplificación y purificación de ADN fueron identificados por visualización de bandas de ~401 pb mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con Gelred® (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA.), en cada corrida electroforética se incluyeron 10 µL del producto de PCR y/o purificado de cada muestra, los correspondientes controles positivos y un marcador de tamaño de 50 pb. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) a 340 nm, para evidenciar las bandas de ADN compatibles en tamaño con el fragmento de los genes en estudio.

3.2.9. Secuenciación: las muestras positivas resultantes de la amplificación por PCR del gen *gltA*, fueron secuenciadas mediante el sistema 3730XL Applied Biosystems®, en la empresa Macrogen inc., Seoul, Korea.

3.2.10. Análisis *In Silico*: el análisis *In Silico* se realizó con las secuencias genéticas obtenidas, comprobando con el cromatograma de cada muestra secuenciada, la identidad de los nucleótidos y corrección de errores de lectura, con el uso del software editor de secuencias y alineamientos múltiples BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), obteniendo secuencias genuinas que permitieron su alineamiento y comparación homóloga con las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH), mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); los alineamientos múltiples de las distintas secuencias se realizaron con el programa en línea Clustal Omega (European Molecular Biology Laboratory EMBL-EBI 2015).

Para el análisis de diversidad genética se consideró el porcentaje de variación de nucleótidos entre secuencias de una misma especie, se calcularon por comparación por pares (Kimura modelo de 2-parámetros), utilizando el software MEGA6. La comparación del par de diferencias de secuencia (D) entre secuencias de consenso se calcularon utilizando la siguiente fórmula $D = 1 - (M / L)$, donde M es el número de posiciones de alineación donde las dos secuencias tienen una base en común, y L es el número total de posiciones de alineación sobre el que las dos secuencias se comparan (Dantas-Torres *et al.*, 2013).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez extraído el ADN de las muestras de sangre y garrapatas obtenidas del muestreo realizado a los 320 caninos, cuya procedencia geográfica se indica en el **Cuadro 1**, estas se procesaron mediante PCR lográndose la amplificación de fragmentos de ~410 pb, de 4 lotes de garrapatas de los 64 generados en la clasificación y 8 muestras de sangre de las 320 obtenidas de los caninos muestreado, estas amplificaciones fueron enviadas a secuenciación, obteniéndose un lote de garrapatas (S18_CS78) y dos muestras de sangre (RS8_CS78 y RS52_CS78) compatibles a *Rickettsia rickettsii* (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Secuencias de *R. rickettsii* obtenidas de garrapatas y caninos de Sinaloa.

<p>1. RS18_CS78 (<i>Rickettsia rickettsii</i> en garrapatas de caninos de Sinaloa)</p> <p>CCATTCACGATGACACGATTGCCGGCATGTCGTGGATTCAGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTGTCTCTCTACTATCA CCTATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGTGATTTTTAT AAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCGAGCAGTATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATT CATTAGTGAATGAAAAGATTACACTATTTATTCAGACCTTTGTAGCTCTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGGGCTGTC GGTCTCTGCGGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCCCTTGTTAGTTC</p>
<p>2. RS8_CS78 (<i>Rickettsia rickettsii</i> en caninos de Sinaloa)</p> <p>GGTCTTCGTATTGATGATTTCAAGGAAGTCGCTTAATTTATTGAATTTACCAATTCAATCCTGATTTATTGAATTTAAGGA AGCAGAGGCATCCCCCGTAGTCCGGGGGGTCTATTCATGGCTCTTTTTCAAATGCGTCAAGAAAGTCTCGTTAAGG AAAGAAAACATTTTTCTCTGATGTTAACTAATACCTGAATTTCTTACTTTGTAACCTTGAGCCTGTTACCTGTTGGCAAC TTTGTCTTAGAGTATTTGTGTGTTTTCGGCTTATTCGGTGTGAGGAGGCTGTGTGCATTCTTGCTTTCCAGCCCCACCCT CTTTGGGTGCCCCATTTCTGACTCAAAAAAGCCCACCATGCGAAAGCCTGATTGACCCTTTTCTGTGCTGCCTGATTACCTT TAGAACATGAGACAGCAACATTGATATCTCCACATGCAGTTTGCAGGACTAACATCGTCTGGAA</p>
<p>3. RS52_CS78 (<i>Rickettsia rickettsii</i> en caninos de Sinaloa)</p> <p>TGGGGCACAACGACACGATTCCAGCATGACAGGAAGCATTCTCCCTCCTAGTTCAATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAA GCAGAGGCATTGTCCCGTCTCTCTGGGTGACCATCATGGTTCTTTTTGGCTGCTTTTCGTAAGACTTGCTTAAGGAAA GACCACATTTTTCCCTGATGAAGAAGTCAATTCCTGTGTTCTTACTGTGATCCCTTTAGGGGGGAACCTTGTTGGCCTCTCT GTTTCTCCCCATTTGCGTGTTCGTCCCTCGGTATGATTGAGGCTGGGTGCCCGGTCGCCGACCCTGTGTGTCTCT CTCTCTCGCGGTCTGTAATAAAAGAAACCCATAATCTGTTGATAAAAATTTTTTTATTCCACTCTCAAACCGGGGGCC CCCTCTCCCATATTTAA</p>

Todas las secuencias obtenidas (fragmento del gen *gltA* de ~401 pb *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas caninas), fueron comparadas por separado con las disponibles en el GenBank, mediante el uso del programa BLAST para el alineamiento de secuencia de tipo local. La secuencia RS52_CS78 de sangre de canino presentó identidad del 100% con secuencias de *Rickettsia rickettsii* de la cepa Guapimirin de Brasil (GenBank KF887241), cepa 12B de Colombia (GenBank KJ735644) y cepa IAL de Brasil (GenBank KJ994337). A su vez la otra secuencia RS8_CS78 obtenida de sangre de canino de Sinaloa, presentó una identidad del 99% con la cepa 12B de Colombia (GenBank KJ735644) y la cepa Itu de Brasil (GenBank KF742602). En el caso de la secuencia RS18_CS78 obtenida de garrapata *R. sanguineus* esta presentó identidad del 99% con las 6 secuencias siguientes: aislado LI2395 de Brasil (GenBank JN375499), aislado A33C008 de Brasil (GenBank JN252695), cepa ICB0403 de Brasil (GenBank JN393854), aislado caso1 de Panamá (GenBank JF739385), cepa 1989CO1 de Carolina del Norte, USA, (GenBank DQ150680) y con la cepa "R" (Bitterroot) de USA. (GenBank U59729). Las

secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en la base de datos del GenBank.

Se efectuó el alineamiento de las secuencias de *Rickettsia rickettsii* obtenidas tanto de sangre como garrapatas de caninos de Sinaloa (**Cuadro 9**), mediante el programa Clustal Omega, apreciándose regiones conservadas y poca similitud entre ellas, la cual se confirma con la matriz de porcentaje de identidad entre secuencias (**Cuadro 10**) cuya identidad entre las *Rickettsias* en sangre fue de 59.81% y de estas con *Rickettsia rickettsii* obtenida de garrapatas fue de 41.16 a 43.34%.

Cuadro 9. Alineamiento entre secuencias de *R. rickettsii* obtenidas de caninos y garrapatas de Sinaloa.

```

RS18_CS78      CCATTCACGATGACACGATTGCCGGCATGTCGTGGATTTCAGACCCGGGTTTATGTCTAC
RS8_CS78       -GGTCTTCGTATTGATGATTTCAAGGAAGTCGCTTAATT-----TATTGAATTTTAC
RS52_CS78      TGGGGCACAACGACACGATT-C---CAGCATGACAGGAA-----GCATTCTCCCTCC
                *      *  **** *      *      *
                *
RS18_CS78      TGCTTC TTGTCTCTCTACTATCACCTATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGC GG CATCG
RS8_CS78       CAATTC AATCC TG--- -ATTTATTGAATTTTAAGGAAGCAGAGGCATCCCCCGGTAGTC
RS52_CS78      TAGTTC AATCC TG--- -ATTTATTGAATTTTAAGGAAGCAGAGGCATTTGTCCC GGT CCTC
                ***      **      * *      ** * * * * * * *      ***
                *
RS18_CS78      AG-GATATGATATTAAAGACTT-----AGCTGAGAAAAGTGATTTTTTA TAAGT
RS8_CS78       CGGGGGGGTCTATTCA TGGCTTCTTTTTC A AATGCGTCAAGAAAGTCTCGTTTAAAGAAA
RS52_CS78      CTGGGGTGACC -ATCATGGTTTCTTTT TGGCTGCTTTTCGTAAGACTTGCTTAAGGAAA
                *      * * * * *      *      ***      * * * *
                *
RS18_CS78      AGCATA TTTAC TGATT TATGGGGAAC TACCAAGTGGCGAGCAGTATAATAATTTACTAA
RS8_CS78       GAAAACATTTTCTCTGATGTTAAAC TAATACC--- TGAATTTCTTACTTTGTAACTTG
RS52_CS78      GACCACATTTTCCCTGATGAAGAACTCATTCC--- TGTGTTTCTTACTGTGATCCCTTT
                ** *      * ***      ****      *      * * *      **
                *
RS18_CS78      ACAGGT TGCTCATCATTCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTATTTTCAGACCTTTTG
RS8_CS78       AGC----- -CTGT TACCTTGTTTGGCAACTTTGTTTCTAGAGTATTT
RS52_CS78      AGG----- -GGGGAACCTTGTTTGGCCTCTCTGTTTCTCCCCATTT
                *      *      * **      * * ****      **
                *
RS18_CS78      TAGCTC TTCTCATCCTATG-----
RS8_CS78       TGTGTGTTTTCGGCTTATTTCGGTGTGAGGAGGCTGTGTGCA -TTCTTGCCTTTCCAGCCC
RS52_CS78      TGCGTGTTTTCGTCCCCTCGGTATGATTTCAGGCTGGGTGCCGGTCCCGCACCCGTGTGT
                *      * ** ** *
                *
RS18_CS78      -----GCTATTATGCTTGCGGCTGTCG
RS8_CS78       GACCCTCTTTGGGTGTCCCATTTCTGACTCAAAAAGCCACCATGCGAAAGCCTGATT

```



```

RS52_CS78      GTGTCTCTCTCTCTCTCGCGGTCTCTGAATAAAAGAAACCCATAATCTGTTTGA----TA
                                     * * **      *

RS18_CS78      GTTCTCTTGCGGCATTTTATCCTGATTTATTGA-----
RS8_CS78       GACCCTTTTCTGTCGTGCCTGATTACCTTTAGAACATGAGACAGCAAACATTGATATCTC
RS52_CS78      AAAATTTT-TTTATTCAC-----TCTCAAACCGG-GGCCCCCTCTCCCATATTTT
                **      *      * * *

RS18_CS78      -----ATTTTAAGGAAGCCCTTTGTTTAGTTC
RS8_CS78       CACATGCAGTTTGCAGGACTAACATCGTCTGGAA-
RS52_CS78      AA-----

```

- (guion) gap de delecion, * (asterisco) Identidad entre columnas, **RS18_CS78** (*R. rickettsii* en garrapatas de caninos de Sinaloa), **RS8_CS78** (*R. rickettsii* en caninos de Sinaloa), **RS52_CS78** (*R. rickettsii* en caninos de Sinaloa)

Cuadro 10. Matriz de porcentaje de identidad entre secuencias de *R. rickettsii* obtenida de garrapatas y caninos de Sinaloa.

	RS18_CS78	RS8_CS78	RS52_CS78
RS18_CS78	100	43.34	41.16
RS8_CS78	43.34	100	59.81
RS52_CS78	41.16	59.81	100

RS18_CS78 (*R. rickettsii* en garrapatas de caninos de Sinaloa), **RS8_CS78** (*R. rickettsii* en caninos de Sinaloa), **RS52_CS78** (*R. rickettsii* en caninos de Sinaloa)

Tanto en el alineamiento múltiple (**Cuadro 9**) como en la matriz de porcentaje de identidad (**Cuadro 10**), se aprecia la tendencia de identidad entre las secuencias, lo cual sugiere que estas pertenecen a diferente clado genético, por lo que se comparó el grupo de secuencias de Sinaloa con las de mayor identidad depositadas en el GenBank, así como las secuencias de Yucatán y Mexicali, generando el alineamiento múltiple de secuencias (**Cuadro 11**) y una matriz de porcentaje de identidad (**Cuadro 12**). se observó una identidad que osciló entre 34.85 a 94.41%, y una relación filogenética con otras especies del grupo de las fiebres manchadas donde la de la mayor identidad fue RS18_CS78 con la cepa LI2307b de Brasil (GenBank JN375522).

Cuadro 11. Alineamiento de secuencias de *R. rickettsii* en caninos y garrapatas de Sinaloa, comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank, incluyendo secuencias depositadas de Yucatán y Mexicali.

```

DQ176856Yucatan
RS8_CS78
RS52_CS78
JN375499
HM012566MexicaliRr1240
HM012571MexicaliI78
RS18_CS78
KF887241Guapimirin
DQ150680strain1989CO1
JF739385isolatecase1
JN375522isolateLI2307b
JN252695isolate
U59729RRU59729R (Bitterroot)
KJ994337cloneIAL
JN393854
KF742602strainItu
KJ735644strainI12B

-----
GGCTTCTTTTCAAATGC--GTCAAGAAAGTCTCGTTTAAAGGAAAGAAAACATTTTCTC
GGTTTCTTTTGGCTGC--TTTCGTAGACTTGCTTAAAGGAAAGACCACATTTTCCC
ACTT---CTTGCACGT--TTCTTAAAGTACTACGGCACGC---GGGTCATAGTTTATA
AATT---CTTGACAAA--GGC-----TAAATATATTGTATA
-----TCTCTATCCGGAACAGTTACCTG-----
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
-----
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
AGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCAGCAGTATAATAATTTAC
-----

DQ176856Yucatan
RS8_CS78
RS52_CS78
JN375499
HM012566MexicaliRr1240
HM012571MexicaliI78
RS18_CS78
KF887241Guapimirin
DQ150680strain1989CO1
JF739385isolatecase1
JN375522isolateLI2307b
JN252695isolate
U59729RRU59729R (Bitterroot)
KJ994337cloneIAL
JN393854
KF742602strainItu
KJ735644strainI12B

-----
TGATGTTAAA-----CTAATACCTGAA-----TTTCTTACTTTGTAAC
TGATGAAGAA-----CTCATTCTGTG-----TTTCTTACTGTGATCC
TATACACGATGACCAAACCATTAATCTAAATGGATCATTTTATATCCTTAGCTTAGCT
AGTTC-----TCAA-----
-----TT--ATTGGA-----TCAA-----
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
TAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAA-----TGAAAGATTACACT
-----

DQ176856Yucatan
RS8_CS78
RS52_CS78
JN375499
HM012566MexicaliRr1240
HM012571MexicaliI78
RS18_CS78
KF887241Guapimirin
DQ150680strain1989CO1
JF739385isolatecase1
JN375522isolateLI2307b
JN252695isolate
U59729RRU59729R (Bitterroot)
KJ994337cloneIAL
JN393854
KF742602strainItu
KJ735644strainI12B

-----
CTTGAGCCTGTACCTTGTGGCAACTTTG---TTTCTAGAGTATTTGTTGTTTTCG
CTTTAGGGGGGAACCTTGTGGCCCTCTG---TTTCTCCCCATTTGCGTGTTTTCG
ATATATTTAGGAATACTCAGAACTACCGATTTCTTAAAGCATACTTATACCGCTTCA
-----
----ATATAATTCCTAATGGGCTCTTCTA-----TATCTGCAGATTTTATATTTACG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
ATTTATTTTCAGACCTTTGTAGCTCTTCTC-----ATCCTATGGCTATTTATGCTTGGG
-----

```

DQ176856Yucatan	-----
RS8_CS78	GCTTATTTCGGTGTGAGGAGGCTGTGTGCA-----TTCTTGCCTTTCAG
RS52_CS78	TCCCCCTCGGTATGATT CAGGCTGGGTGC---C-----CGGTCCCACCCCTG
JN375499	TCAGCCCCCGCTGAGCAGGTC CCCAAAGT GAGGCAA TACCCGTGCTAATACAAGCAAAA
HM012566MexicaliRr1240	-----
HM012571MexicaliT78	TTA-----AAGTGGTAG-----T-----
RS18_CS78	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
KF887241Guapimirin	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
DQ150680strain1989CO1	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
JF739385isolatecase1	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
JN375522isolateLI2307b	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
JN252695isolate	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
U59729RRU59729R (Bitterroot)	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
KJ994337cloneIAL	-----CGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
JN393854	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
KF742602strainItu	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
KJ735644strainI12B	GCT-----GTCGGTTCCTTGCGGCATTTTA-TCCTGATTTATTGAATTTAAG
DQ176856Yucatan	-----
RS8_CS78	CCCGACCCTCTTTGGG-----TGTCCCCATTTCTGACT--CAAAAAGCC---CACCA
RS52_CS78	TGTGTGTCTCTCTC-----TCTCGCGGTCTCTGAAT--AAAAGAAACC---CATAA
JN375499	GGGTTAGCTCCGGATGAGCCGGCAATT CGGACTGTGAAGTAGAAGCATTTCTGCTCATGA
HM012566MexicaliRr1240	----AGCA-----CCTTCAGAATG-----
HM012571MexicaliT78	TAATTCTTGTGTACTTTACGAATATTACCA-----
RS18_CS78	GAAGCCCTTTGTTAGTTC-----
KF887241Guapimirin	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG
DQ150680strain1989CO1	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG
JF739385isolatecase1	GAAGC-----
JN375522isolateLI2307b	GAAGCA-----
JN252695isolate	GAAGCA-----
U59729RRU59729R (Bitterroot)	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG
KJ994337cloneIAL	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG
JN393854	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG
KF742602strainItu	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG
KJ735644strainI12B	GAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT TGCTA ----AGATACCTACCATCG

Cuadro 12. Matriz de porcentaje de identidad de secuencias de *R. rickettsii* en caninos y garrapatas de Sinaloa, comparadas con secuencias de mayor identidad depositadas en GenBank, incluyendo secuencias depositadas de Yucatán y Mexicali.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1: DQ176856Yucatan	100	34	22.22	40	28.36	35.29	nan	46.15	46.24	nan	nan	nan	45.54	46.17	46.13	46.07	45.91
2: RS8_CS78	34	100	59.81	38.36	36.03	37.25	37.62	38.23	38.44	38.64	38.51	38.51	39.17	41.77	38.06	38.48	39.12
3: RS52_CS78	22.22	59.81	100	42.16	31.01	31.72	33.23	35.94	36.03	34.75	34.75	34.64	35.94	34.65	35.89	35.94	35.94
4: JN375499	40	38.36	42.16	100	53.12	36.97	43.02	45.69	45.37	44.05	44.11	44.2	45.19	46.14	45.99	45.87	45.51
5: HM012566MexicaliRr1240	28.36	36.03	31.01	53.12	100	23.91	38.31	37.3	37.3	38	38.89	38.41	37.01	36.27	37.55	37.3	37.3
6: HM012571MexicaliT78	35.29	37.25	31.72	36.97	23.91	100	52.99	52.48	52.89	52.43	51.92	51.92	52.89	53.1	52.89	52.89	52.89
7: RS18_CS78	nan	37.62	33.23	43.02	38.31	52.99	100	88.95	88.95	90.93	94.41	90.69	88.95	82.35	93.46	88.95	88.95
8: KF887241Guapimirin	46.15	38.23	35.94	45.69	37.3	52.48	88.95	100	99.81	99.74	100	99.74	99.72	99.72	99.9	99.72	99.72
9: DQ150680strain1989CO1	46.24	38.44	36.03	45.37	37.3	52.89	88.95	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10: JF739385isolatecase1	nan	38.64	34.75	44.05	38	52.43	90.93	99.74	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11: JN375522isolateLI2307b	nan	38.51	34.75	44.11	38.89	51.92	94.41	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12: JN252695isolate	nan	38.51	34.64	44.2	38.41	51.92	90.69	99.74	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13: U59729 R_Bitterroot_	45.54	39.17	35.94	45.19	37.01	52.89	88.95	99.72	100	100	100	100	100	100	100	100	100
14: KJ994337cloneIAL	46.17	41.77	34.65	46.14	36.27	53.1	82.35	99.72	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15: JN393854	46.13	38.06	35.89	45.99	37.55	52.89	93.46	99.9	100	100	100	100	100	100	100	100	100
16: KF742602strainltu	46.07	38.48	35.94	45.87	37.3	52.89	88.95	99.72	100	100	100	100	100	100	100	100	100
17: KJ735644strainl12B	45.91	39.12	35.94	45.51	37.3	52.89	88.95	99.72	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Se generaron árboles filogenéticos por separado, apreciándose en la **Figura 9**, el correspondiente a la secuencia RS18_CS78, ubicada junto con la cepa Iowa, que de acuerdo con Clark *et al.* (2015), es una cepa avirulenta, lo cual muestra que se encuentra dentro del grupo de las fiebres manchadas y sugiere estar presente en los hospederos sin presentar manifestaciones clínicas evidentes.

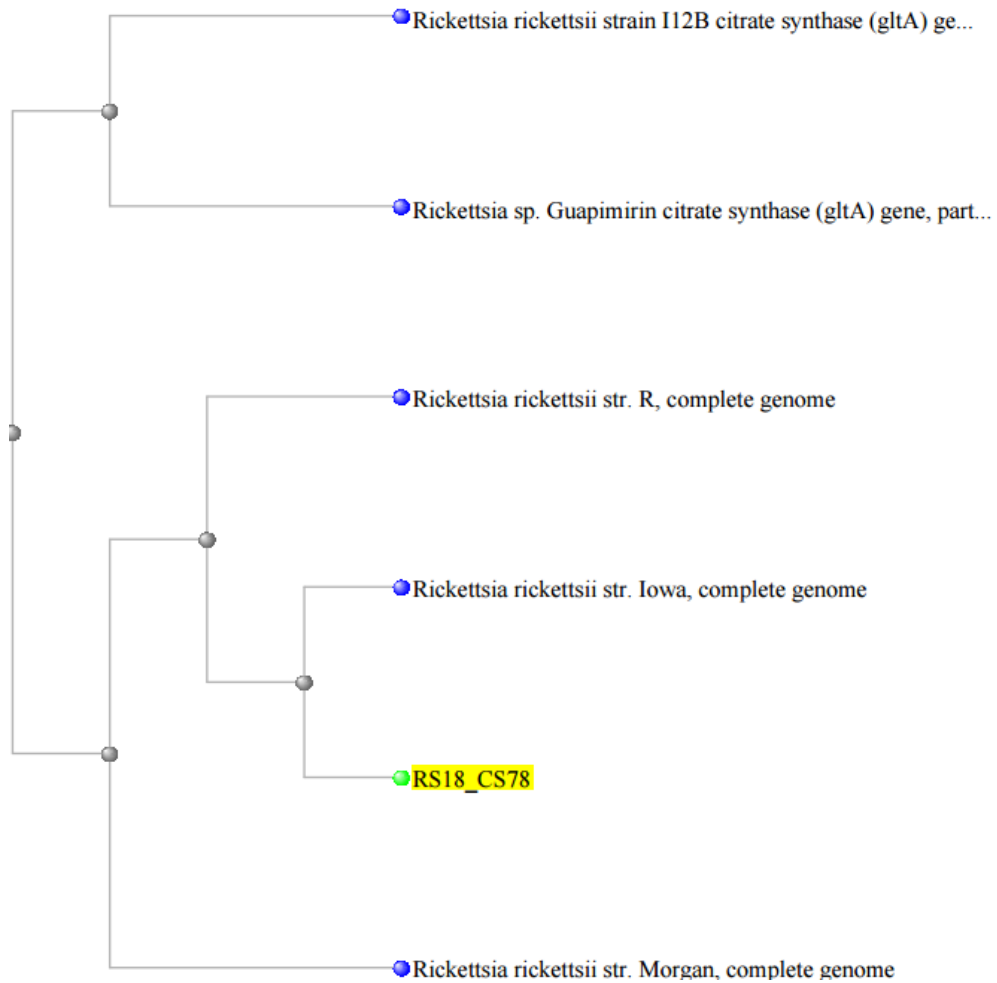


Figura 9. Árbol filogenético de secuencia RS18 de *R. rickettsii* en Garrapatas de caninos de Sinaloa comparado con secuencias del GenBank, mediante sistema de unión de vecinos (*Neighbour-joining tree*, MOLE-BLAST).

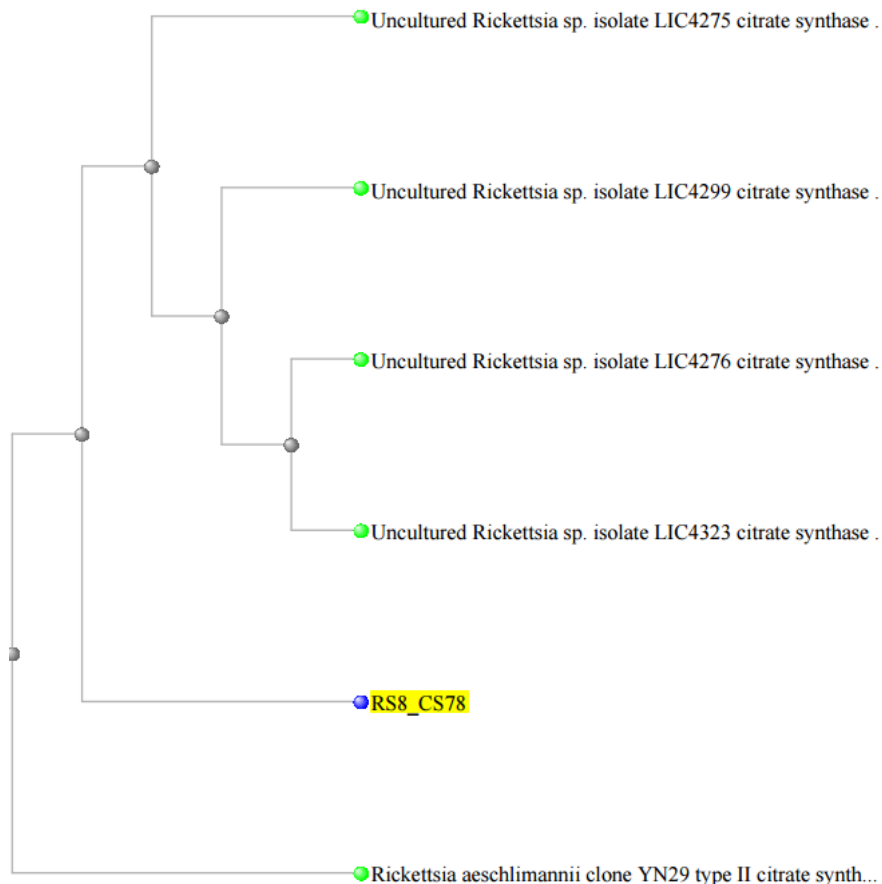


Figura 10. Árbol filogenético de secuencia RS8 de *R. rickettsii* en sangre de caninos de Sinaloa comparado con secuencias del GenBank, mediante sistema de unión de vecinos (*Neighbour-joining tree*, MOLE-BLAST).

En las **Figuras 10** y **11**, se puede observar la filogenia de las secuencias obtenidas de sangre canina (RS8_CS78 y RS52_CS78, respectivamente), las cuales se sitúan en nodos diferentes a las secuencias más cercanas, y en ambos casos es *Rickettsia aeschlimannii* Clon YN29 Tipo II. De acuerdo a Merhej *et al.* (2014), *R. aeschlimannii* pertenece a las Rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el subgrupo *R. massiliae* junto con *R. massiliae* MTU5, *R. massiliae* AZT80, *R. rhipicephali*, y *R. raoultii*; y concuerda con Walker (2013), en que ocasiona posibles casos con infecciones asintomáticas o cuadros clínicos benignos subdiagnosticados o desapercibidos para el personal médico, en comparación con una enfermedad severa usualmente presente en la rickettsiosis por *R. rickettsii*.

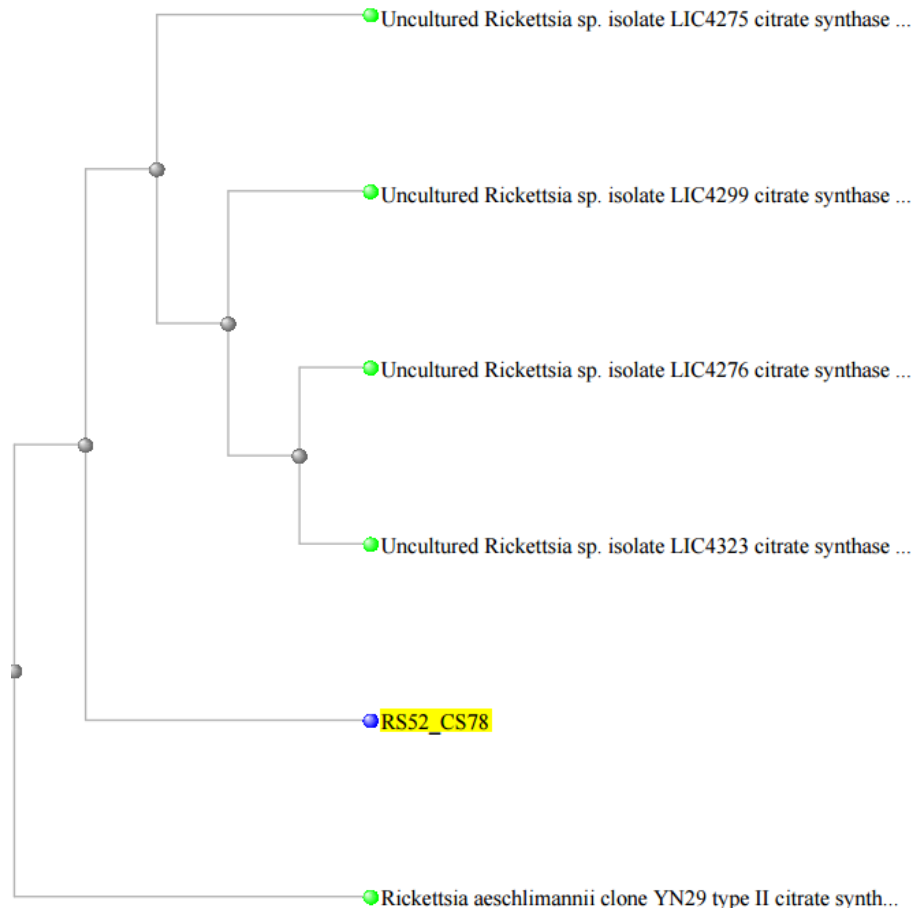


Figura 11. Árbol filogenético de secuencia RS52 de *R. rickettsii* en sangre de caninos de Sinaloa comparado con secuencias del GenBank, mediante sistema de unión de vecinos (*Neighbour-joining tree*, MOLE-BLAST).

Cuadro 13. Matriz de porcentaje de identidad de secuencias de *R. rickettsii* obtenidas de caninos y garrapatas de Sinaloa comparadas con secuencias de Yucatán y Mexicali.

1: RS18_CS78	100.00	39.37	34.39	38.66	42.02	40.25
2: DQ176856Yucatán	39.37	100.00	34.96	39.08	40.44	37.74
3: HM012571MexicaliT78	34.39	34.96	100.00	40.34	38.75	43.50
4: HM012566Mexicali	38.66	39.08	40.34	100.00	45.31	42.35
5: RS8_CS78	42.02	40.44	38.75	45.31	100.00	59.81
6: RS52_CS78	40.25	37.74	43.50	42.35	59.81	100.00

RS18_CS78 (*R. rickettsii* en garrapatas de caninos de Sinaloa), **RS8_CS78** (*R. rickettsii* en caninos de Sinaloa), **RS52_CS78** (*R. rickettsii* en caninos de Sinaloa).

Al realizar la comparación de las secuencias de *Rickettsia rickettsii* obtenidas de caninos y garrapatas de Sinaloa con secuencias de Yucatán y Mexicali, mediante la matriz de porcentaje de identidad de secuencias (**Cuadro 13**), se observa que existe una identidad muy baja desde 34.39 a 45.31%, donde la mayor identidad se presenta entre las de Sinaloa y Mexicali.

Se concuerda con Eremeeva *et al.* (2011), quienes detectaron la circulación de un tipo genético único de *Rickettsia rickettsii* en las garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* en Mexicali, Baja California, México, donde *R. rickettsii mexicana* difiere tanto de las secuencias de Sinaloa como de todos los aislados previamente caracterizados de las regiones endémicas de las Fiebres Manchadas de las Montañas Rocosas en norte, centro y sur de América, con base a estudios realizados por Karpathy *et al.* (2007), a 36 aislamientos de *R. rickettsii* de diferentes regiones de América, quien describe, para este microorganismo siete genotipos distribuidos en tres clados filogenéticos, con una correlación basada en origen geográfico y especie de garrapata vector: Clado I (genotipo 1 [relacionado con garrapatas *R. sanguineus* de Arizona en EEUU] y genotipos 2 y 3 [relacionados con garrapatas *D. variabilis* del este y oeste-medio de los EEUU]); Clado II (genotipos 1 y 2 [relacionados con la cepa Sheila Smith y aislamientos provenientes de *D. andersoni* en el estado de Montana y Carolina del norte en EEUU]); y el clado III (genotipo 1 [aislamientos provenientes de Brasil, Costa Rica y Panamá] y genotipo 2 [aislamiento proveniente de Colombia] probablemente relacionados con garrapatas *A. cajennense* y *A. aureolatum*). Complementado con la presencia y validación de un cuarto clado patógeno (*R. rickettsii* cepa Hlp), caracterizado molecularmente a partir de un caso fatal ocurrido en el norte de los EEUU (Paddock *et al.*, 2014). A su vez, este mismo estudio corroboró la distribución geográfica previamente propuesta de los otros tres clados, al mostrar una relación directa entre las cepas referencia de *R. rickettsii* y casos fatales en América (Faccini-Martinez *et al.*, 2014).

Considerando el estudio de Karpathy *et al.* (2007), las secuencias de *rickettsia* de Sinaloa se ubican en el clado III, con base en el resultado del análisis de identidad del BLAST de las secuencias de Sinaloa con las disponibles en el GenBank.

Por otra parte, considerando el algoritmo de clasificación taxonómica del género *Rickettsia* presentado por Raoult *et al.*, (2005), para postular una nueva *Rickettsia* spp., son necesarios porcentajes de similitud inferiores a los establecidos en por lo menos 3 genes rickettsiales (99.8% gen *rrs*, 99.9% gen *gltA*, 98.8% gen *ompA*, 99.2% gen *ompB* y 99.3% gen *sca4*) respecto a una especie ya caracterizada, y como *Candidatus*, si no es posible su aislamiento (Faccini-Martinez *et al.*, 2014). Con base en lo anterior y considerando que el porcentaje de similitud de las secuencias del gen *gltA* obtenidas de caninos y garrapatas de Sinaloa fue inferior a lo establecido, no se puede descartar la presencia de nuevas especies de *Rickettsias* del grupo de las fiebres manchadas en caninos y garrapatas en Sinaloa.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de *R. rickettsii* en sangre y garrapatas *R. sanguineus* de caninos domésticos de Sinaloa, evidenciando la circulación de esta especie bacteriana y a un mayor riesgo de diseminación y adquisición de esta enfermedad zoonótica.

Resulta conveniente evaluar con mayor precisión las posibles variaciones genéticas entre las poblaciones de *R. rickettsii* en caninos y garrapatas; tal conocimiento puede contribuir a una mejor comprensión de las diferencias regionales en la epidemiología de esta enfermedad transmitida por garrapatas *R. sanguineus*.

Por otra parte la estandarización de la técnica de diagnóstico mediante PCR, favorece la detección temprana de *Rickettsia rickettsii*, lo cual puede convertirse en una prueba de rutina de gran ayuda para el médico a fin de tomar una decisión a tiempo para iniciar el tratamiento adecuado; además permitirá al personal de laboratorio diferenciar entre las especies de *Rickettsia*, ayudando en los estudios de diagnóstico, epidemiológicos y epizootiológicos con la consecuente implementación de medidas para su prevención.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

Morfológica y genéticamente se identificó a las garrapatas presentes en caninos atendidos en clínicas veterinarias de Sinaloa, como *Rhipicephalus sanguineus*.

Genéticamente se identificó y confirmó la presencia de *Rickettsia rickettsii* en sangre y garrapatas de caninos atendidos en clínicas veterinarias de Sinaloa.

Las diferencias genéticas regionales observadas en las garrapatas *R. sanguineus*, puede ser multifactorial, desde condiciones geográficas, introducción e hibridación por migración de caninos infestados hasta su competencia vectorial aun cuestionable. De igual manera para *R. rickettsii* y su cercanía con la cepa Iowa avirulenta con presencia sin manifestaciones clínicas que la evidencien.

Considerando que los propietarios que llevan a sus caninos a las clínicas veterinarias, reflejan preocupación, responsabilidad e interés por el bienestar y la salud de sus mascotas, y que a pesar de ello los caninos presentan garrapatas que pueden estar infectados con *Rickettsia rickettsii*, es posible suponer que en el resto de los caninos que hay en las ciudades y que no reciben estas atenciones por parte de sus dueños, así como aquellos que no tienen dueño, se pueden encontrar infestados con garrapatas y *Rickettsia rickettsii*. Estos caninos pueden actuar en el mantenimiento, distribución y transmisión tanto del vector como de esta enfermedad a otros hospederos incluidos los humanos, lo que conlleva a mayor riesgo de diseminación y adquisición de esta enfermedad zoonótica.

Se cuenta con los elementos que corroboran la hipótesis planteada, lo cual representa una alerta epidemiológica y epizootiológica para la región en general, y sirve como base para advertir sobre el riesgo de transmisión de las zoonosis en cuestión, e implementar acciones de educación sanitaria y medidas de prevención y control en programas de salud pública y animal a fin de evitar su propagación, y con ello ayudar a disminuir el riesgo de transmisión de esta enfermedad de los caninos al ser humano.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

- Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Pinter, A., Gennari, S., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B., 2007. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J. Med. Entomol.* 44, 126–132.
- Álvarez-Hernández G., Contreras Soto J.J. 2013. Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de Sonora, 2004-2012 *Salud Publica Mex.* 55: 2, marzo-abril de 2013.
- Álvarez-Hernández G., 2010. Rocky Mountain spotted fever: a forgotten epidemic. *Salud Publica Mex.* 52: 1–3.
- Anaya E, Morón C, Arias P, Chauca J, Román R. 2008. Evaluación de pruebas de elisa e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra rickettsiosis. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2008; 25(3): 336-39.
- Beati, L., Keirans, J.E., 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.* 87, 32–48.
- Benavides O.F., López V.G., 2005. Clave Pictórica para la Identificación de Garrapatas en Colombia y Norte de Sudamérica. 2005. Centro de Investigación en Salud Animal. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
- Berrada, Z.L., Telford 3rd, S.R. 2009. Burden of tick-borne infections on American companions animal. *Top. Companion Anim. Med.* 24, 175-181.
- Beugnet, F., Marie J.L. 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 298-305.
- Buckingham SC, Marshall GS, Schutze GE, Woods CR, Jackson MA, Patterson LE, Jacobs RF. 2007. Tick-borne infections in Children Study Group. Clinical and laboratory features, hospital course, and outcome of Rocky Mountain Spotted Fever in children. *J Pediatr;* 150(2):180-4.
- Buitrago Medina, D.A y Pachón Melo, H.E., 2008. Epidemiología de las Rickettsiosis, una revisión narrativa. Aporte para la vigilancia epidemiológica. Trabajo de grado para optar al título de Especialistas en Epidemiología. Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública Héctor Abad Gómez, Sede Bogotá, Colombia.
- Burlini, L., Texeira, K.R.S., Szabó, M.P.J., Famadas, K.M., 2010. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern *Exp. Appl. Acarol.* 50, 361–374.
- Bustamante M.E., Varela G. 1944. Características de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora y Sinaloa. *Rev Inst Salub Enf Trop* 1944; 5:129-136.

- CDC, 2003. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in family clusters--three states,. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004 May 21;53(19):407-10.
- Chen LF, Sexton DJ. 2008. What's new in Rocky Mountain Spotted Fever? Infect Dis Clin N Am. 22: 415-32.
- Childs JE, Paddock CD. 2002. Passive Surveillance as an Instrument to Identify Risk Factors for Fatal Rocky Mountain Spotted Fever: Is There More to Learn? Am J Trop Med Hyg. 2002;66(5):450-7.
- Chomel B. 2011. Tick-borne infections in dogs-An emerging infectious threat, Veterinary parasitology 179, 294-301.
- Cicuttin, Gabriel L, Vidal, Pablo, Nazarena De Salvo, M, Beltrán, Fernando J, & Gury Dohmen, Federico E. 2014. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Rev. chil. infectol.*, 31(5), 563-568.
- Clark, T.R., Noriea N.F., Bublitz, D.C., Ellison, D.W., Martens C., Lutter E.I., Hackstadt T. 2015. Comparative Genome Sequencing of *Rickettsia rickettsii* Strains Differing in Virulence. *Infect Immun.* 2015 Feb 2. pii: IAI.03140-14.
- Cruz, V. C., García V.Z y. Morales S.M. 1998. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* infestation in dogs in Cuernavaca, Morelos, México. *Parasitol* 22(1-2): 29-32. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201998000100005>.
- Cruz-Vázquez Carlos and García-Vázquez Zeferino. 1999. Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Experimental & Applied Acarology*, 23 (1999) 277–280.
- Cunha, N.C., Fonseca, A., Rezende, J., Rozental, T., Favacho, A., Barreira, J.D., Massard, C.L., Lemos, E.R.S., 2009. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* tick in the State of Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 105–108.
- Dantas-Torres F. 2007. Rocky Mountain spotted fever. *The Lancet Infect Dis* 2007; 7:724–32. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70261-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70261-X).
- Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 152:173–185.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the Brown dogs tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* . 3:26. <http://dx.doi.org/10.1186%2F1756-3305-3-26>.
- Dantas-Torres F., Latrofa M.S., Annoscia G., Giannelli A., Parisi A., Otranto D. 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors.* 2013. 6:213. doi:10.1186/1756-3305-6-213.
- Dabanch P. Jeannette. 2003. Zoonosis. *Rev Chil Infect*; 20 (Supl 1): S47 - S51.

- Debárbora, V.N.; Oscherov, E.B.; Guglielmone, A.A.; Nava, S., 2011. Garrapatas (Acari: Ixodidae) asociadas a perros en diferentes ambientes de la provincia de Corrientes, Argentina., *InVet.* 2011, 13(1): 45-51.
- De la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., and Sonenshine, D.E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontier Bioscience* 13: 6938–46. May 2008.
- Demma, L.J., Traeger M,S., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Blau, D.M., Eremeeva, M.E., Dasch, G.A., Levin, M.L., Singleton Jr., J., Zaki, S.R., Cheek, J.E., Swerdlow, D.L., McQuiston, J.H. 2005. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.* 353: 587-594.
- DGSA 2004. Manual de Identificación Taxonómica de Garrapatas. Dirección General de Salud Animal, Dirección de Campañas del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal México.
- Dumler J, Walker D. 2005. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. *N Engl J Med.* 2005 Aug;353(6):551-3.
- Duncan, A.W., Correa, M.T., Levine, J.F., Breitschwerdt, E.B., 2005. The dog as a sentinel for human infection: prevalence of *Borrelia burgdorferi* C6 antibodies in dogs from southeastern and mid-Atlantic States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5, 101-109.
- Elston D.M., 2005. Rickettsial skin disease: uncommon presentations. *Clin Dermatol.*;23(6):541-4.
- Eremeeva ME, Zambrano ML, Anaya L, Beati L, Karpathy SE, Santos-Silva MM, Salceda B, MacBeth D, Olguín H, Dasch GA, Aranda CA. 2011. *Rickettsia rickettsii* in Rhipicephalus ticks, Mexicali, Mexico. *J Med Entomol.* Mar;48(2):418-21.
- Eremeeva ME. Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Dec;3(5-6):332-7.
- Estrada-Peña A, Ayllón N and de la Fuente J., 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Front. Physio.* 3:64. doi: 10.3389/fphys.2012.00064.
- Estripeaut D, Aramburú MG, Sáez-Llorens X, Thompson HA, Dasch GA, Paddock CD, Zaki S, Eremeeva ME. 2007. Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerg Infect Dis.*;13(11):1763-5.
- Faccini-Martínez AA, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA. 2014. Syndromic classification of rickettsioses: An approach for clinical practice. *International Journal of Infectious Diseases* 28 (2014) 126–139.
- Field-Cortazarez, J. y Seijo-y-Moreno J.L., 2011. Rickettsiosis en Baja California. *Bol.Clin. Hosp. Infant. Edo. Son.*28(2); 44-50.
- Fournier P., Raoult D. Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of *Rickettsia*. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Diseases*. New York: Informa Health Care; 2005. p. 1-14.

- Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. Ann N Y Acad Sci. 2009 May;1166:1-11.
- Galaviz-Silva L, Pérez-Treviño KC, Molina-Garza ZJ. 2013. Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo León, Mexico, and their association with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Exp Appl Acarol. Dec;61(4):491-501. doi: 10.1007/s10493-013-9707-5. Epub 2013 Jun 8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749032>.
- Gammons M.M.D. and Salam G.M.D. 2002. Tick removal. American Family Physician, Vol 66, number 4, august 15, 2002. www.aafp.org/afp.
- Gaxiola, C.S.M.; Obregón, J.F.; Domínguez, C.I.E.; Quintero, M.M.T.; Cabrera, V.J.A., Rubio, R.M.C. 1997. Prevalencia de *Rhipicephalus sanguineus* en canideos, en dos colonias de diferente nivel socioeconómico de Culiacán. Sinaloa. México. Mem. XII Congr. Latinoam. Parasitol. nov. 1997. p. 320-321.
- Gervasoni, S.H., Guglielmone, A.A., Tarabla, H.D., Ruiz, M.F. 2003. Factors associated with *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) household infestation (Latreille, 1806). Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. <http://www.sciquest.org.nz/node/63450>.
- Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, Sobral BS, & Azad AF. 2007. Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. PLoS One. 2007;2(3):e266.
- Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, Dharmanolla C, Rainey D, Soneja J, Shallom JM, Vishnubhat ND, Wattam R, Purkayastha A, Czar M, Crasta O, Setubal JC, Azad AF, Sobral BS. 2008. Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. PloS one 2008; 3(4): e2018.
- Gómez Rivera Norberto, Alvarez-Hernandez G., García Zárate M.G., Fonseca, C.I., Villalobos G.L., Cano R.M.A., 2013. Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en niños: experiencia hospitalaria. Rev. Mex. Pediatría. Vol 80, Núm 6, Nov-Dic 2013. Pp 227-231.
- Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Peña A, Levin M. 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Ticks Tick Borne Dis. 2013 Apr;4(3):171-80. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.12.003. Epub 2013 Feb 1.
- Guglielmone A., G. Bechara, P. Szabó, D. Barros-Batesti, J. Faccini, M. Labruna, R. Vega, M. Ardua, M. Campos, J. Furlong, A. Mangold, J. Martins, M. Rodríguez, J. M. Venzal, y A. E. Peña. 2009. Guía Neotropical; Garrapatas de importancia médica y veterinaria: América latina y el Caribe. www.cnog.com.mx/Sanidad/Garrapata/Guia_Neotropical_Esp.pdf.
- Gutiérrez, G. C. N., M. C. Martínez y F.J. Triana. 2009. Identificación microscópica y molecular de ehrlichias en perros del estado de Aragua Venezuela. Rev. Salus online. Vol. 12: Sup. 1. 197- 204.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Helmick CG, Bernard KW, D'Angelo LJ. 1984. Rocky Mountain spotted fever: clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. J Infect Dis. 1984 Oct;150(4):480-8.
- Heymann, David L. 2005. El control de las enfermedades transmisibles. 18ª ed. Washington, D.C.: OPS,. (Publicación Científica y Técnica No. 613).
- Hidalgo M, Vega JF, Lizarazo D, Valbuena G. 2009. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009;80(6):1029-1030.
- Holman R. C. Holman , Jennifer H. McQuiston , Dana L. Haberling , and James E. Cheek. 2009. Increasing Incidence of Rocky Mountain Spotted Fever among the American Indian Population in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(4), 2009, pp. 601–605
- Houhamdi L, Raoult D. 2006. Experimentally infected human body lice (*Pediculus humanus humanus*) as vectors of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia conorii* in a rabbit model. *Am J Trop Med Hyg.*;74(4):521-5.
- INEGI. 2011. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Gobierno de México. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Sinaloa., <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>.
- INDRE, 2015. Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de la Rickettsiosis por Laboratorio. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Gobierno de México. Versión No. 01.INDRE, 2015.
- Karpthy S.E., Gregory A. Dasch and Marina E. Eremeeva. 2007. Molecular Typing of Isolates of *Rickettsia rickettsii* by Use of DNA Sequencing of Variable Intergenic Regions *Journal Of Clinical Microbiology*, Aug. 2007, P. 2545–2553 DOI: 10.1128/JCM.00367-07.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 42:90–98. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>.
- Labruna M, Kamakura O, Moraes-Filho J, Horta MC, Pacheco R. 2009. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):458-60.
- López Del PJ, Abarca VK, Azocar AT. 2007. Clinical and serological evidence of canine rickettsiosis in Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2007;24:189-93.
- Mangold, A.J., Barges, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S *rRNA* sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera

- among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484.
- Martínez-Medina Miguel Ángel, Gerardo Álvarez-Hernández, José Guillermo Padilla-Zamudio y María Guadalupe Rojas-Guerra. 2007. Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en niños: consideraciones clínicas y epidemiológicas. *Gac Méd Méx* Vol. 143 No. 2.
- Marquez-Jimenez F. J. Hidalgo-Pontiveros A., Contreras-Chova F., Rodríguez-Liévana J.J. y Muniain-Ezcurra M.A. 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2005;23(2):94-102.
- McNabb S. J., Jajosky R. A., Hall-Baker P. A., 2007. Summary of notifiable diseases United States, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 54: 1–92.
- Mekuzas, Y., L. Gradoni, G. Oliva, V. Foglia Manzillo, and G. Baneth. 2009. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:30-31.
- Mercado Uribe, M.C. 2010. Rickettsiosis Historia y actualidades. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, vol. 30, núm. 1, p. 25-31 enero-marzo 2010.
- Merck Sharp y Dohme, 2015. Infecciones producidas por rickettsias. Manual Merck de Información Médica para el Hogar. <https://www.msdsalud.es/manual-merck-hogar/seccion-1/infecciones-producidas-rickettsias.html>. 2015 Merck Sharp and Dohme de España S.A., J. Valcárcel, 38 - 28027 Madrid. NOND-1117228-0000.
- Merhej V., and Raoult D., 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev.* (2011), 86, pp. 379–405. 379. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x.
- Merhej V., Angelakis E, Socolovschi C, Raoult D. 2014. Genotyping, Evolution and Epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infection, Genetics and Evolution* 25:122-37.
- Mikszewski JS, Vite CH. 2005. Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2005 Jul-Aug;41(4):259-66.
- Morales-Soto M y Cruz-Vázquez C. 1998. Fluctuaciones poblacionales de *Rhipicephalus sanguineus*, garrapata parásita de perros, en el valle de Cuernavaca, Morelos, México. Estudio preliminar. *Vet.Méx.*, 29(3)1998. P299-301.
- Moraes-Filho,J., Marcili,A., Nieri-Bastos,F.A., Richtzenhain,L.J., and Labruna, M.B. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 117, 51–55.doi: 10.1016/j.actatropica.2010.09.006.
- Moraes-Filho, J., Soares, J.F., Labruna, M.B., 2012. Vector competence of four populations *Rhipicephalus sanguineus* neotropical the region in a stream bacteria *Ehrlichia canis* during blood meal. In: FAMERP-UTMB: Emerging Infections in the Americas - common interests and collaboration between Brazil and USA, 2012,

- São José do Rio Preto - SP. Anais do FAMERP-UTMB, 2012.
- Morón C, Ochoa M, Laguna Torres VA. 2001. Tifus exantemático. Lima: Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología (OGE), Instituto Nacional de Salud (INS).
- Mumcuoglu, K. Y., K. Frish, B. Sarov, E. Manor, E. Gross, Z. Gat Z, and R. Galun. 1993. Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group rickettsiae. *Journal of Medical Entomology* 30(1):114-121.
- Nava Santiago, Mariano Mastropaolo, José M. Venzal, Atilio J. Mangold, Alberto A. Guglielmono. 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitology* 190 (2012) 547– 555.
- Needham Gleen R. 1985. Evaluation of five Popular Methods for Tick removal. *Pediatrics* Vol. 75 No.6 June 1985. p997-1002.
- Nicholson, W.L., Allen, K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt, E.B., Little. S.E. 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.* 26, 205-212.
- Ober CP, Spaulding K, Breitschwerdt EB, Malarkey DE, Hegarty BC. 2004. Orchitis in two dogs with Rocky Mountain spotted fever. *Vet Radiol Ultrasound.* 2004 Sep-Oct;45(5):458-65.
- Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, & Labruna MB. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of Sao Paulo, Brazil. *Parasitology.* 2012 Sep;139(10):1283-300.
- Olano JP. Rickettsial infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1063:187-96. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1355.031>.
- Oliveira KA, Pinter A, Medina-Sanchez A, Boppana VD, Wikel SK, Saito TB, Shelite T., Blanton L., Popov V., Teel P.D., Walker D.H., Galvao M.A.M., Mafra C., Bouyer D.H. 2010. *Amblyomma imitator* as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. *Emerg Infect Dis J.* Volume 16, Number 8—August. DOI: 10.3201/eid1608.100231. (<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/8/10-0231.htm>).
- Openshaw JJ, Swerdlow DL, Krebs JW, Holman RC, Mandel E, Harvey A, Haberling D, Massung RF, McQuiston JH. 2010. Rocky mountain spotted fever in the United States, 2000-2007: interpreting contemporary increases in incidence. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Jul;83(1):174-82.
- OPS. 2004. Consulta OPS/OMS de expertos sobre Rickettsiosis en las Américas: Informe final. Área de Prevención y Control de Enfermedades. Unidad de Salud Pública Veterinaria. Ouro Preto, Minas Gerais-Brasil, 18-19 septiembre, 2004.
- O'Reilly M, Paddock C, Elchos B, Goddard J, Childs J, Currie M. 2003. Physician knowledge of the diagnosis and management of Rocky Mountain Spotted Fever. Mississippi 2002. *Ann NY Acad Sci* 2003; 990: 295-301.

- Osorio, M.P. 2009. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa PCR y su aplicación en alimentos. Gpo. De investigaciones mellitopalinogicas y propiedades fisicoquímicas de alimentos, Universidad de Colima. <http://www.scribd.com/doc/16621934/Fundamentos-de-PCR> 1
- Oteo A. José, Nava S., Sousa R., Mattar S., Venzal J.M., Abarca K., Labruna M.B., y Zavala-Castro J., 2014. Guías Latinoamericanas de la Red Iberoamericana para la Investigación y Control de las Enfermedades Rickettsiales (RIICER) para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev. Chilena Infectol.*; 31 (1): 54-65. Available: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100009>.
- Otranto, D., F. Dantas-Torres, and E. B. Breitschwerdt. 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 25:157-163.
- Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, Labruna MB. 2011. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med. Vet. Entomol.* 25:148–155. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00915.x>.
- Paddock CD, Brenner O, Vaid C, Boid D, Berg J, Joseph R, Zaki S, Childs J. 2002a. Concurrent Rocky Mountain Spotted Fever in a Dog and its Owner *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2):197-9.
- Paddock CD, Holman RC, Krebs JW, Childs JE. 2002b. Assessing the magnitude of fatal Rocky Mountain spotted fever in the United States: comparison of two national data sources. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Oct;67(4):349-54.
- Paddock CD, Dension AM, Lash RR, Liu L, Batten BC, Dahlgren FS, Kanamura CT, Angerami RN, Pereira Dos Santos FC, Brasil Martines R, Karpathy SE. 2014. Phylogeography of *Rickettsia rickettsii* genotypes associated with fatal Rocky Mountain spotted fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10.4269/ajtmh.14-0146
- Papazahariadou M.G., Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Papadopoulus, E.G. and Leontides, L., 2003. Tick infestation of dogs in Thessaloniki, northern Greece. *Med. Vet. Entomol.* 17(1). p. 110-113.
- Parola P y Raoult D. 2001. Tick and Tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32:897–928.
- Parola P., Paddock CD, Raoult D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*;18(4):719-756.
- Parola, P., Socolovschi, C., Jeanjean, L., Bitam, I., Fournier, P.E., Sotto, A., Labauge, P., Raoult, D. 2008. Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2(11): e338. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000338>.
- Parola P, Paddock CD., Socolovschi C., Labruna MB., Mediannikov O., Kernif T.,

- Yazid Abdad M., Stenos J., Bitam I., Fournier PE., and Raoult D. 2013. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013 26(4): 657-702; doi:10.1128/CMR.00032-13.
- Pino de la Llave, Liliana. 2006. Principales géneros de garrapatas identificados en perros del área urbana atendidos en consulta privada y su asociación con infecciones hemoparasitarias. tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad veracruzana. 2006.
- Pinter A, França A, de Souza CE, Sabbo C, Do Nascimento EM, Dos Santos FC, Labruna M, Holcman M, Chinelatto MJ, Horta MC, Mascheretti M, Mayo RM, Angerami, RN, Brasil RA, De Souza SS, Colombo S, Oliveira VL. 2011. Febre Maculosa Brasileira. *Boletim Epidemiológico Paulista.* 2011;Sup. 8(1):1-31.
- Piranda EM, Faccini JL, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, Labruna MB. 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008;103(7):696-701.
- Quintero Vélez Juan Carlos, Marylin Hidalgo, Juan David Rodas González. 2012. Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *SIC: 2027-1352(2012,,01/04)* vol.17:1, 82-99.
- Ramírez-Barrios, Roger A, Chacón, Everts, Barboza, Glen, Fernández, Gibson, Valera, Zulayne, Villalobos, Alberto, & Angulo-Cubillón, Francisco. 2008. Garrapatas (Acari: Ixodidae) Recolectadas de Caninos Bajo Asistencia Veterinaria en Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica*, 18(3), 267-270. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000300005&lng=es&tlng=es.
- Randolph S.E., 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology.* 2004;129 Suppl:S37-65., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15938504>.
- Raoult D, Paddock C D. 2005. *Rickettsia parkeri* and other spotted fever infections in the United States. *N Engl J Med* 2005; 353: 626-7.
- Raoult D, Fournier PE, Ereemeeva M, Graves S, Trick PA, Oteo JA, Tamura A, Tarasevich I & Zhang L. 2005. Naming of rickettsiae and rickettsial diseases. *Ann NY Acad Sci* 1063: 1–12.
- Raoult D, Parola P. 2007. *Rickettsial Diseases.* Informa Healthcare; CRC Press. 26/04/2007. Taylor y Francis Group. 6000 Broken Sound Parkway NW, suite 300, Boca Raton FL. USA. 33487-2742. ISBN 13:978-1-4200-1997-1.
- Raoult D, Parola R. 2008. Rocky Mountain Spotted Fever in the USA: a benign disease or a common diagnostic error? *Lancet Inf* 2008; 8: 587-588.
- Ricketts HT. 1909. A micro-organism, which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever. *Journal of the American Medical Association.* 1909; LII(5):379-380. doi:10.1001/jama.1909.25420310039002.

- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Apr;47(2):252-61.
- Roux V, Raoult D. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 Jul;50 Pt 4:1449-55.
- Sahni SK, Narra HP, Sahni A, Walker DH. 2013. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiology* 8(10):1265-88.
- Saito TB, Cunha-Filho NA, Pacheco RC, Ferreira F, Pappen FG, Farias NA, Larsson CE, Labruna MB. 2008. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.*;79(1):102-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 14.
- Sanches, Gustavo Serón. 2013. Comparação biológica, morfológica e molecular entre carrapatos do complexo *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). / Gustavo Seron Sanches. - Rio Claro, 2013. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Brasil.
- Santibáñez Sáenz Sonia. 2014. Rendimiento de diferentes métodos de PCR en el diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas transmitidas por garrapatas. Tesis Doctoral, Universidad de la Rioja, España.
- Sasanelli, M., P. Paradies, G. Lubas, D. Otranto, and D. de Caprariis. 2009. Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. *Vet. Rec.* 164:22-23).
- Scorpio DG, Wachtman LM, Tunin RS, Barat NC, Garyu JW, Dumler JS. 2008. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. *Journal of American Association for Laboratory Animal Science* 2008;47(5):23-28.
- Sexton DJ, Kaye KS. 2002. Rocky mountain spotted fever. *Med Clin North Am.* 2002 Mar;86(2):351-60.
- Shimada, Y., Beppu, T., Inokuma, H., Okuda, M., Onishi, T., 2003. Ixodid tick species recovered from domestic dogs in Japan. *Med. Vet. Entomol.* 17, 38–45.
- Silveira JA, Passos LM, Ribeiro MF. 2009. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol.* 2009 May 12;161(3-4):270-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.028. Epub 2009 Feb 6.
- Silber JL. 1996. Rocky Mountain spotted fever. *Clin Dermatol.* 1996 May-Jun;14(3):245-58.

- SINAVE, 2010. Rickettsiosis una enfermedad presente pero olvidada. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaria de Salud, Gobierno de México. Boletín Epidemiológico Num.46, Vol. 27, semana 46 del 14 al 20 de noviembre de 2010.
- SINAVE, 2012. Aviso epidemiológico Rickettsiosis. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaria de Salud, Gobierno de México. Boletín Epidemiológico, 15 de noviembre de 2012.
- SINAVE, 2014. Rickettsiosis transmitidas por ácaros, garrapatas y *pedículos hominis*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaria de Salud, Gobierno de México. Boletín Epidemiológico Num.40, Vol. 31, semana 40 del 28 sept. al 04 octubre del 2014.
- SINAVE, 2015a. Casos por entidad federativa de enfermedades transmitidas por vector hasta la semana epidemiológica 52 del 2014 (Cuadro 7.1, pag.30). Boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información, Secretaria de Salud, Gobierno de México. Num 53, Vol 31, semana 53 del 28 diciembre al 03 enero 2015.
- SINAVE, 2015b. Casos por entidad federativa de enfermedades transmitidas por vector hasta la semana epidemiológica 53 del 2014 (Cuadro 7.1, pag. 28). Boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información, Secretaria de Salud, Gobierno de México. Num 1, Vol 32, semana 1 del 04 al 10 enero 2015.
- Socolovschi Cristina, Mediannikov Oleg, Raoult, Didier., Parola, Philippe., 2009. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks., *Vet. Res.* 2009 40:34., www.vetres.org., DOI: 10.1051/vetres/2009017.
- Souza, B.M., Leal, D., Barboza, D.C., Uzeda, R.S., Alcántara, A.C., Ferreira, F., Labruna, M.B., Gondim, L.F., Franke, C.R., 2010. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria.* 19, 89–93.
- Stothard DR, Fuerst PA. 1995. Evolutionary Analysis of the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* Using 16S rRNA Gene Sequences. *Systematic and Applied Microbiology.* 1995;18(1):52-61.
- Szabó,M.P.J., Cunha,T.M.,Pinter, A., and Vicentini, F. 2001. Ticks (Acari:Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Exp.Appl. Acarol.* 25, 909–916.doi:10.1023/A:1020433003028.
- Szabó,M.P.J., Mangold, A.J.,Carolina,J.F., Bechara,G.H., and Guglielmone,A.A. 2005. Biological and DNA evidence of Two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari:Ixodidae) in South America. *Vet.Parasitol.* 130, 131–140.doi: 10.1016/j.vetpar.2005.03.008.
- Telford SR GH. 2004. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'?. *Parasitology* 2004;129:301– 327.

- Thorner AR, Walker DH, Petri WA, Jr. 1998. Rocky Mountain Spotted Fever. Clin Infect Dis. 1998 Dec;27(6):1353-9.
- Thursfield. 2005. Veterinary Epidemiology. Tercera Edición. Blackwell publishing.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M.T., Rentería-Evangelista, T.B., González-Medina, Y., Barreras-Serrano, A., Hori-Oshima, S., Moro, M.H., Vinasco, J. 2009a. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. Veterinary Record 164, 59-61.
- Tinoco-Gracia L., Quiroz-Romero H., Quintero-Martínez M.T., Rentería-Evangelista T.B., Barreras-Serrano A., Romano-Osuna M., García-Prieto B.J., Escárcega-Ávila A.M. 2009b. Prevalencia de Infestación de Garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en Perros y su Asociación a Factores de Riesgo en la Zona Urbana de Mexicali, Baja California, México. VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria, 26-28 de Oct. de 2009, Mérida, Yucatán, Méx. Trabajo 98, pág. 242. <http://ampave.org/archivosmemorias/MEMORIASyucatanCONAPAVET2009>.
- Tringali, G., Intonazzo, V., Perna, A.M., Mansueto, S., Vitale, G., Walker, D.H., 1986. Epidemiology of boutonuse fever in western Sicily. Distribution and prevalence of spotted fever group rickettsial infection in dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Am J Epidemiol 123, 721-727.
- Ugochukwu, E.I., Nnadozie, C.C., 1985. Ectoparasitic infestation of dogs in Bendel State, Nigeria. Int J Zoonoses 12, 308-312.
- Venzal J. M., Estrada-Peña, A., Castro, O., Carlos G. De Souza, Aránzazu P. And Oteo, J.A. 2007. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. Parasitol Latinoam 62: 23 - 26, 2007 FLAP.
- Walker DH. 2002. *Rickettsia rickettsii*: As virulent as ever. Am J Trop Med Hyg 2002; 66 (5): 448-449.
- Walker D. 2013. The challenge of rickettsial diagnosis, research, and awareness in Latin America. Acta Méd. Costarric. 55(Suppl 1):S4–S6.
- Walker D, Ismail N. 2008. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nature Reviews* 6(5):375-86.
- Weinert L., Werren J.H., Aebi A., Graham N. S. and Jiggins F.M. 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biology 2009, 7:6 doi:10.1186/1741-7007-7-6.
- WHO World Health Organization, Zoonoses and Veterinary Public Health Department of Food Safety, Zoonoses, and Food borne Diseases Sustainable Development and Healthy Environments. 2006. The control of neglected zoonotic diseases: a route to poverty alleviation: report of a joint WHO/DFID-AHP meeting, 20 and 21 September 2005, WHO Headquarters, Geneva, with the participation of FAO and OIE. WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland. <http://www.who.int/zoonoses>.

- Wilson LB, Chowning WM. 1904. Studies in *Pyroplasmosis hominis* ("spotted fever" or "tick fever" of the Rocky Mountains). *J. Infect Dis* 1904;1:31–57.
- Yabsley MJ, Breitschwerdt EB, Delaski KM, Moraru GM. 2013. Rickettsiosis. American Association of Zoo Veterinarians Infectious Disease Committee Manual 2013.
- Zavala-Castro, J. E., Zavala-Velázquez, J. E., Walker, D. H., Ruiz A., E. E., Laviada-Molina, H., Olano, J. P., Ruiz-Sosa J. A., Small, M. A., Dzul-Rosado, K. R. 2006. Fatal Human Infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 672–674. doi:10.3201/eid1204.051282.
- Zermeño E.M.E, Tinoco-Gracia L., Elsa del Carmen Villegas Moran, Jorge Alejandro Martínez Partida, Arturo Cardona Sánchez. 2012. Comunicación y educación para la salud que previenen muertes por rickettsiosis. *RECIIS – R electr. De Com. Inf. Inov. Saúde*, Rio de Janeiro, v6, n4, Dez., 2012. www.reciis.icict.fiocruz.br, DOI: 10.3395/receis.v6i4.664es.