

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Caracterización del microbioma bacteriano en base a la región 16S rDNA y su asociación  
con patógenos de importancia médica en garrapatas de hospederos silvestres del norte de  
la República Mexicana**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**POR:**

**M en C MARIANA CUESY LEÓN**

**FEBRERO, 2021**

**Caracterización del microbioma bacteriano en base a la región 16S rDNA y su asociación con patógenos de importancia médica en garrapatas de hospederos silvestres del norte de la República Mexicana**

**Comité de Tesis**



---

DRA ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA

**Director de Tesis**



---

DR. LUCIO GALAVIZ SILVA

**Secretario**



---

DRA MARIA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ

**Vocal**



---

DRA LICET VILLARREAL TREVIÑO

**Vocal**



---

DRA PATRICIA TAMEZ GUERRA

**Vocal**



Subdirectora de Posgrado  
SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al ETERNO por acompañarme y guiarme a lo largo este tiempo y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A le doy gracias a mi familia:

A mi Esposo Oscar Alberto Pérez, a mis padres Griselda León y Eduardo Cuesy, a mis hermanos Miriam, Ileana, Miguel Ángel y Daniela, a mis suegros Severiano Pérez y Araceli Narváez. A mis amigos porque también son familia.

Por su amor, cariño, apoyo y creer en mí siempre.

Agradezco a mi comité de tesis:

A la Dra. Zinnia J. Molina Garza y al Dr. Lucio Galaviz Silva por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por su gran apoyo para realizar esta tesis.

A la Dra. Maria Porfiria Barrón Gonzales, Dra. Licet Villareal Treviño y Dra Patricia Tamez Guerra por su apoyo y amabilidad para formar parte de mi comité.

Gracias a todos por su tiempo y paciencia para realizar las correcciones de este trabajo y consejo durante el desarrollo del mismo.

También doy mi más sincero agradecimiento:

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio pues fueron un gran ejemplo de trabajo en equipo, ayuda y aprendizaje para mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada para el desarrollo de este trabajo.

A Susana Pérez Saucedo de la Organización de Vida Silvestre, al Ing. Isaías Galván Castro de la Unión Ganadera Regional de N.L., a Taxidermia Internacional y Taxidermia Rodríguez. Por su apoyo en la colecta de muestras de las cuales dependía para realizar esta tesis.

Sin cada uno de ustedes: familia, maestros, amigos, compañeros, etc. no podría haber logrado este trabajo, el cual significa mucho para mí desarrollo personal y profesional

***“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los que se asocian” Lynn Margulis***

## DEDICATORIA

*A mi esposo:*

*Por amor, cariño y apoyo en todos estos años juntos*

*A mis padres:*

*Porque han sido fundamentales en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica,  
como de la vida, por su apoyo incondicional*

*A mis hermanos:*

*Por el cariño que siempre me han brindado*



## ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE TABLAS .....	5
LISTA SIMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN .....	9
SUMMARY .....	9
INTRODUCCION .....	13
ANTECEDENTES .....	15
1. Vector.....	15
1.1 Ciclo de vida .....	16
1.2 Distribución.....	18
2- Principales enfermedades transmitidas por garrapatas .....	19
2.1 Enfermedad de Lyme.....	21
2.2 Rickettsiosis.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2.3 Anaplasmosis .....	30
2.4 Ehrlichiosis .....	34
2.5 Babesiosis .....	38
2.6 Tularemia .....	43
3- Reservorios .....	46
4- Coinfecciones .....	49
5- Interacciones vector-huésped- patógeno.....	51
5- Diversidad del microbioma de las garrapatas.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
JUSTIFICACIÓN .....	60
HIPÓTESIS.....	61
OBJETIVOS .....	61
Objetivo general.....	61
Objetivos particulares .....	61
MATERIAL Y MÉTODOS.....	62
Área de estudio .....	62
Colecta de garrapatas .....	64
Ficha entomológica.....	64

Identificación de garrapatas. ....	64
Extracción del ADN a partir de garrapatas. ....	65
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	66
Caracterización del microbioma intestinal.....	68
RESULTADOS.....	70
Identificación taxonómica del vector .....	70
1. <i>Otobius megnini</i> .....	72
2. <i>Boophilus microplus</i> .....	73
3. Género <i>Dermacentor</i> .....	73
3.1 <i>Dermacentor nitens</i> .....	74
3.2- <i>Dermacentor hunteri</i> .....	74
4- Género <i>Amblyomma</i> .....	75
4.1 Complejo <i>Amblyomma cajennense</i> .....	75
4.2 Complejo <i>Amblyomma maculatum</i> .....	76
qPCR para la cuantificación por curva estándar de patógenos transmitidos por garrapatas ..	76
Caracterización de microbioma de las especies de garrapatas colectadas. ....	79
DISCUSIONES.....	88
CONCLUSIONES .....	95
PERSPECTIVAS.....	96
BIBLIOGRAFÍA .....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de la garrapata de venado. Tomada de: <a href="http://www.cdc.gov/lyme/transmission/index.html">http://www.cdc.gov/lyme/transmission/index.html</a> .....	18
Figura 2- Distribución de especies de garrapatas en México (Sosa-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2015).....	19
Figura 3 -Taxonomía de <i>Borrelia burgdorferi</i> . Karami (2012).....	24
Figura 4 Distribución geográfica de la enfermedad de Lyme y genospecies de <i>B.</i> <i>burgdorferi</i> . Tomada de: Kurtenbach <i>et al.</i> (2006).....	26
Figura 5 a) Distribución de las rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas b) distribución de las principales rickettsias en México y Centroamérica Tomada de: <a href="https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick">https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick</a> y Parola <i>et al.</i> (2013) .....	30
Figura 6 Ciclo de vida intracelular de <i>Anaplasmataceae</i> . Tomada de Pruneau <i>et al.</i> (2014) .....	33
Figura 7 a) Distribución de Anaplasmosis a nivel mundial y b) distribución de anaplasmosis bovina en México. Tomada de <a href="https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick">https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick</a> y Rodríguez <i>et al.</i> (2009) .....	34
Figura 8 Ciclo intracelular de <i>Ehrlichia spp.</i> Tomada de Sunil (2016) .....	37
Figura 9 Distribución geográfica de Ehrlichiosis monocítica humana. Tomada de: <a href="https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick">https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick</a> .....	38
Figura 10- Ciclo de vida de <i>Babesia spp.</i> (CDC, 2015).....	41
Figura 11 Distribución de Babesiosis, se muestra zonas endémicas y no endémicas. Tomada de: <a href="https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick">https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick</a> .....	42
Figura 12 Ciclos Zoonóticos de <i>Francisella tularensis</i> . Tomada de Leal-Balbino <i>et al.</i> (2017). .....	44
Figura 13 Ciclo celular de <i>Francisella tularensis</i> . Tomada de Celli y Zahrt (2013) .....	45
Figura 14 Tomada de: <a href="https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick">https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick</a> .....	46
Figura 15 Ejemplos de conflicto (A) y cooperación (B) en las interacciones garrapata- patógeno- huésped. Tomada de De la Fuente <i>et al.</i> (2016) .....	52
Figura 16 Mecanismos inmunes y moleculares que constituyen barreras potenciales para la transmisión de patógenos. Tomada de Hajdušek <i>et al.</i> (2013).....	53
Figura 17 Interacciones moleculares Garrapata- Patógeno, Los patógenos activan mecanismos (1) y manipulan las respuestas de protección contra garrapatas y otros procesos biológicos para facilitar la infección (2), mientras que las garrapatas responden para limitar la infección y preservar la aptitud alimenticia y la competencia vectorial para la supervivencia de garrapatas y patógenos (3). MG, intestino medio; HE, hemocito; SG, glándula salival; MSPs, proteínas de superficie mayores; HSPs, proteínas de choque térmico; ER, retículo endoplásmico. Tomada de De la Fuente <i>et al.</i> (2017).....	54
Figura 18 Cambios en el microbioma de la garrapata y la consecuente respuesta inmune en el intestino de la garrapata. Tomada de Narasimhan y Fikrig (2015).....	55

Figura 19 Origen y adquisición del microbioma bacteriano de las garrapatas. Tomada de Bonnet <i>et al.</i> (2017).....	57
Figura 20 Principales géneros bacterianos representativos del microbioma de las garrapatas. Tomada de Narasimhan y Fikrig (2015).....	58
Figura 21 Filogenia de 10 de los principales géneros de endosimbiontes en garrapatas. Tomada de Bonnet <i>et al.</i> (2017) .....	59
Figura 22 Posible impacto del microbioma de la garrapata en la transmisión de patógenos. Tomada de De la Fuente <i>et al.</i> (2017) .....	60
Figura 23 Flujo general de trabajo seguido como estrategia experimental del estudio. Modificada de Greay <i>et al.</i> (2018).....	62
Figura 24 Ubicación Geográfica de las zonas de muestreo .....	63
Figura 25 Distribución corporal de las distintas especies de garrapatas colectadas .....	72
Figura 26 Características taxonómicas de <i>Otobius megnini</i> (Walker <i>et al.</i> , 2014).....	72
Figura 27 Características morfológicas para la identificación taxonómica de <i>Boophilus microplus</i> (Walker <i>et al.</i> , 2014).....	73
Figura 28 Características morfológicas para la identificación taxonómica del género <i>Dermacentor</i> sp. (Walker <i>et al.</i> , 2014).....	73
Figura 29 Características morfológicas para la identificación taxonómica de <i>D.nitens</i> (Hoskins, 1991; Walker <i>et al.</i> , 2014).....	74
Figura 30 características morfológicas para la identificación taxonómica de <i>D. hunteri</i> . (Furman y Loomis, 1984; Hoskins, 1991).....	74
Figura 31 Principales características morfológicas para la identificación taxonómica del género <i>Amblyomma</i> .(Walker <i>et al.</i> , 2014).....	75
Figura 32 Características morfológicas para la identificación de especies del complejo <i>A. cajennense</i> (Guzmán-Cornejo <i>et al.</i> , 2011; Nava <i>et al.</i> , 2014) .....	75
Figura 33 Características morfológicas para la identificación taxonómica de especies del complejo <i>A. maculatum</i> (Guzmán-Cornejo <i>et al.</i> , 2011; Lado <i>et al.</i> , 2018) ...	76
Figura 34 Curva estándar y gráfica de amplificación para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	77
Figura 35 Curva estándar y grafica de amplificación para <i>Rickettsia rickettsi</i> .....	77
Figura 36 Curva estándar y gráfica de amplificación para <i>Ehrlichia chaffeensis</i> .....	77
Figura 37 Curva estándar y gráfica de amplificación para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	78
Figura 38 Curva estándar y gráfica de amplificación para <i>Babesia microti</i> .....	78
Figura 39 Principales especies bacterianas que conforman el microbioma de las especies de garrapatas colectadas de venado .....	81
Figura 40 Microbioma de <i>R.microplus</i> y <i>D.nitens</i> , de acuerdo a la localidad de colecta. ....	83
Figura 41 Microbioma de machos y hembras de <i>R. microplus</i> y <i>D. nitens</i> colectados....	84
Figura 42 Composición del microbioma bacteriano de garrapatas <i>D. hunteri</i> machos y hembras.....	87

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Principales enfermedades transmitidas por garrapatas modificada de: León-Artozqui (2012b); Vayssier-Taussat <i>et al.</i> (2015). .....	20
<b>Tabla 2</b> Clasificación clínica de la enfermedad de Lyme, tomada de: Portillo <i>et al.</i> (2014).....	22
<b>Tabla 3</b> Clasificación y características clínico-epidemiológicas de las especies de <i>Rickettsia</i> de mayor interés clínico. Tomada de: Bernabeu-Wittel y Segura-Porta (2005). .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 4</b> Especies del género <i>Anaplasma</i> , vectores y su distribución. Tomada de: Dantas-Torres y Otranto (2017).....	32
<b>Tabla 5</b> Principales especies de <i>Ehrlichia</i> . Tomada de Little (2017).....	36
<b>Tabla 6</b> Principales especies de <i>Babesia</i> de importancia médico-veterinaria. Resumida de Dantas-Torres <i>et al.</i> (2017) con énfasis en especies de importancia humana y/o en América.....	40
Tabla 7 Síndromes Clínicos de Tularemia. Tomada de Harik (2013) .....	43
Tabla 8 Coinfecciones y como estas alteran la biología de los microorganismos. Tomada de Cabezas-Cruz <i>et al.</i> (2018).....	50
Tabla 9 Primer y sondas utilizados para el diagnóstico de patógenos transmitidos por garrapatas .....	66
Tabla 10 Oligonucleótidos sintetizados como controles positivos de enfermedades transmitidas por garrapatas. ....	67
Tabla 11 Condiciones de termociclado para qPCR de patógenos transmitidos por garrapatas. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 12 Datos obtenidos en las colectas del norte de la República Mexicana.....	71
Tabla 13 Cuantificación de controles positivos para patógenos transmitidos por garrapatas .....	76
Tabla 14 Principales órdenes bacterianos encontrados en las especies de garrapatas colectadas de venado.....	80
Tabla 15 Índices de Shannon de alfa diversidad por especie de garrapata, localidad y sexo. ....	82
Tabla 16 Análisis SIMPER entre especies de garrapatas colectadas en venado. Se muestra las 5 familias con el mayor porcentaje de contribución.....	82
Tabla 17 Índices de alfa diversidad (intervalos de confianza) para hembras y machos de <i>D. hunteri</i> . ....	85
Tabla 18 Principales taxones identificados en el microbioma de <i>D.hunteri</i> . ....	86

## LISTA SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Microgramos	mg
Mililitros	mL
Milímetros cúbicos	mm <sup>3</sup>
Latitud/Longitud	Lat/Lon
hectáreas	has
microlitros	μL
Revoluciones por minuto	rpm
Pares de bases	pb
Cloruro de magnesio	MgCl <sub>2</sub>
Desoxiribonucleótidos	dNTP's

## RESUMEN

Las garrapatas pueden transmitir numerosos agentes patógenos, lo que les confiere gran importancia como vectores en personas y animales, siendo superados a nivel mundial, únicamente por los mosquitos. Estas pueden estar coinfectadas con múltiples patógenos, y dada la alta tasa de transmisión vertical de los endosimbiontes residentes en su tracto digestivo, los patógenos casi siempre concurren con estos microorganismos; sin embargo, la mayoría de los estudios sobre las relaciones entre las garrapatas, el huésped vertebrado y el patógeno, han dado poca consideración a toda la comunidad microbiana de endosimbiontes y otros microbios de función desconocida, así como a sus interacciones. Estas asociaciones pueden afectar la colonización, transmisión y virulencia de patógenos humanos y animales. En este trabajo se colectaron 4 especies de garrapatas distintas: *R. microplus*, *D. nitens*, *O. megnini*, *D. hunteri*, además de especímenes de los complejos de *Amblyomma cajenennse* y *A. maculatum*, y se observó que preferían alimentarse de manera significativa en las orejas, cabeza y cuello ( $p < 0.05$ ) con respecto a la escapula o patas del cuerpo del hospedero donde se colectaron. Por su parte, se logró estandarizar protocolos para el diagnóstico mediante qPCR de patógenos transmitidos por garrapatas, como *E. chaffeensis*, *R. rickettsi*, *A. phagocytophilum*, *B. bugdorferi*, y *B. microti* y se realizó la cuantificación de estos 5 patógenos en las muestras de garrapatas colectadas de venado cola blanca y borrego cimarrón, las cuales dieron por debajo de  $1 \times 10^7$  Nc/mL (Negativas). Además, se realizó la secuenciación de la región de DNA que codifica para 16s ribosomal por Illumina para la caracterización del microbioma de las garrapatas colectadas; las especies con mayor diversidad en su microbioma fueron *R. microplus*, *D. nitens* y *A. maculatum*, y se observó que el microbioma en la mayoría de las hembras es menos diverso que en los machos, lo que significa que la diversidad del microbioma se ve afectada por el sexo. En venado cola blanca el phylum predominante fue el de Proteobacterias, seguido por los phylum Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Fusobacteria; Para el género *Amblyomma* se observó colonización de *Acinetobacter*, y la presencia de *Borrelia hermsii* (0.4%) en garrapatas del complejo *A. cajennense*. En borrego cimarrón solo se colectaron garrapatas de la especie *D. hunteri* y se encontró que su microbioma está constituido principalmente por Thiotrichales, específicamente por *Francisella tularensis*, la cual representó un 73.4% en machos y un 99.7% en hembras.

Estudios realizados en el país, muestran una amplia distribución de patógenos transmitidos por garrapatas, lo que sugiere la presencia de enfermedades endémicas no reconocidas y que es necesario determinar qué asociaciones entre el vector y los patógenos pueden dar lugar a la transmisión del agente, o representar un ciclo zoonótico silencioso; por lo que el conocimiento de la distribución de garrapatas en Norte de México, su abundancia e intensidad de estas sobre venados cola blanca y borrego cimarrón, así como conocer el papel que desempeña el microbioma del vector en el establecimiento, colonización y transmisión de los patógenos, permite implementar medidas preventivas o control en ranchos cinergistas, además de prevenir nuevos vectores que pueden ser causantes potenciales de enfermedades infecciosas de salud pública y zoonótica.



## SUMMARY

Ticks can transmit numerous pathogens, which gives them great importance as vectors in people and animals, being surpassed worldwide, only by mosquitoes. These can be coinfecting with multiple pathogens and given the high rate of vertical transmission of endosymbionts resident in their digestive tract, pathogens almost always concur with these microorganisms; however, most studies about relationships between ticks, vertebrate host, and pathogen have given little consideration to entire microbial community of endosymbionts and other microbes with unknown function, as well as their interactions. These associations can affect the colonization, transmission and virulence of human and animal pathogens. In this work, 4 different tick species were collected: *R. microplus*, *D. nitens*, *O. megnini*, *D. hunteri*, as well as specimens from the *Amblyomma cajennense* and *A. maculatum* complexes, and it was observed that they preferred to feed significantly on the ears, head and neck ( $p < 0.05$ ) with respect to the scapula or legs of the host's body where they were collected. For its part, it was possible to standardize protocols for the diagnosis by qPCR of pathogens transmitted by ticks, such as *E. chaffeensis*, *R. rickettsi*, *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, and *B. microti* and the quantification of these 5 pathogens was carried out in the tick samples collected from white-tailed deer and bighorn sheep, which gave below  $1 \times 10^7$  Nc / mL (Negative). In addition, the DNA region coding for ribosomal 16s was sequenced by Illumina for the characterization of the microbiome of the collected ticks; the species with the greatest diversity in their microbiome were *R. microplus*, *D. nitens* and *A. maculatum*, and it was observed that microbiome in most females is less diverse than in males, which means that the diversity of the microbiome is affected by sex. In white-tailed deer, predominant phylum was Proteobacteria, followed by phylum Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Fusobacteria; For *Amblyomma* genus, *Acinetobacter* colonization and the presence of *Borrelia hermsii* (0.4%) were observed in ticks of the *A. cajennense* complex. In bighorn sheep, only *D. hunteri* ticks were collected and it was found that its microbiome is constituted mainly by Thiotrichales, specifically by *Francisella tularensis*, which represented 73.4% in males and 99.7% in females.

Studies carried out in the country show a wide distribution of pathogens transmitted by ticks, which suggests the presence of unrecognized endemic diseases and that it is necessary to determine which associations between the vector and the pathogens can give rise to the transmission of the agent, or represent a silent zoonotic cycle; Therefore, knowledge of ticks distribution in Northern Mexico, their abundance and intensity on white-tailed deer and bighorn sheep, as well as the role that the vector microbiome plays in the establishment, colonization and transmission of pathogens , allows the implementation of preventive or control measures in cinergy farms, in addition to preventing new vectors that can be potential causes of infectious diseases of public health and zoonotic.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son transmisores de una amplia gama de patógenos de importancia médica y veterinaria, tales como *Babesia spp.*, *Borrelia spp.*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Rickettsia spp.* Por lo tanto son consideradas de gran relevancia como vectores entre personas y animales, superadas a nivel mundial, únicamente por los mosquitos (Parola y Raoult, 2001; Claerebout *et al.*, 2013). Una especie de garrapata puede transmitir una variedad de patógenos que a menudo coexisten en el mismo *foci* natural. Por lo que si un animal o humano es mordido por una garrapata con coinfecciones puede resultar en una patogenicidad más complicada y un peor pronóstico de la enfermedad (Chen *et al.*, 2014). El riesgo de coinfección humana difiere según la ubicación geográfica y depende de la prevalencia de patógenos dentro de los reservorios naturales y garrapatas (Swanson *et al.*, 2006).

Por otro lado, las interacciones que se producen entre las comunidades microbianas dentro de la garrapata, conformadas de manera importante por endosimbiontes obligados (además de virus, bacterias y eucariotas), pueden afectar la colonización, transmisión y virulencia de patógenos ya sea directa, o indirectamente, además, varía según el sexo, especie y ubicación geográfica de la garrapata (Greay *et al.*, 2018; Treuren *et al.*, 2015). Bonnet *et al.* (2017) explica que la composición de las comunidades microbianas se debe a factores como: medio ambiente (laboratorio o silvestre), especie, estadio de desarrollo, estado de alimentación, época de recolección, región geográfica y presencia de patógenos. Además de la vía transovárica, que sirve como primer inóculo en el desarrollo de huevos y larvas; la cópula y el microbioma de la piel del huésped también pueden contribuir a esta diversidad. Otras variables que también se pueden considerar son: grado de alimentación, moléculas inmunes del hospedador presentes en la ingesta sanguínea y cambios intestinales en respuesta a la alimentación; sin embargo, de los diversos microbiomas ambientales a los que puede acceder la garrapata, solo unos pocos se convierten en miembros "auténticos" del microbioma (Greay *et al.*, 2018).

Así mismo, Estrada-Peña *et al.* (2020) encontraron que las comunidades de bacterias en el microbioma de garrapatas son funcionalmente redundantes, y sugieren que las garrapatas seleccionan el microbioma que cumple un conjunto básico de funciones; además, géneros como *Rickettsia*, *Coxiella* o *Francisella* ponen el reto de diferenciar entre patógenos y endosimbiontes, dada su evidente proximidad genética, pero los estudios sobre las relaciones entre garrapatas,

el huésped vertebrado y el patógeno, han dado por lo general poca consideración a estas interacciones y a toda la comunidad microbiana entera, incluyendo endosimbiontes y otros microbios de función desconocida, y el papel de los endosimbiontes de garrapatas en la transmisión de patógenos solo se ha estudiado en algunas pocas especies bacterianas y de garrapatas. (Bonnet *et al.*, 2017; Clay *et al.*, 2010; De la Fuente *et al.*, 2017).

Debido a lo anterior, y a que en el país hay pocos estudios acerca de coinfecciones y por lo tanto correlaciones entre los principales patógenos transmitidos por garrapatas, el objetivo de este estudio es caracterizar el microbioma de garrapatas colectadas de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) en localidades del norte de la república mexicana, para determinar su correlación con la presencia de patógenos de importancia clínica y veterinaria con el fin de evaluar de los riesgos para la salud humana de las áreas estudiadas

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Vector

La incidencia de enfermedades transmitidas por garrapatas (TBD), nuevas y reemergentes, está en aumento por lo que son un problema de salud pública para todo el mundo TBDs, y algunas como las encefalitis (TBE), se consideran prioritarias (Dantas-Torres y Otranto, 2013).

La actividad de estos artrópodos parásitos trae consigo efectos directos en el hospedero como:

1. La pérdida de sangre que ocasiona debilitamiento e inclusive anemia.
2. Desarrollo de miasis.
3. Inflamación de la piel y prurito, frecuentemente acompañado por pérdida de pelo (alopecia) o engrosamiento de la piel (liquenificación).
4. Respuestas tóxica y alérgica provocadas por los antígenos y sustancias anticoagulantes presentes en la saliva de los artrópodos inoculada durante el proceso de alimentación (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

Como consecuencia de sus hábitos hematófagos, las garrapatas tienen un papel relevante en la transmisión de distintos microorganismos patógenos y su potencial vectorial se justifica debido a:

- Lo prolongado de su período de alimentación, que permite la transmisión bidireccional de los agentes patógenos.
- Digestión intracelular de la sangre ingerida.
- La transmisión transestadial (larva → ninfa →adulto) y vertical (transmisión transovárica de la hembra a la siguiente generación a través del ovario) de distintos agentes (p. ej., distintas *Rickettsia*).
- La coincidencia durante la alimentación de distintos estadios de una misma especie, lo que favorece la transmisión horizontal de los agentes patógenos.

- Su capacidad para alimentarse sobre distintos hospedadores, que permite la transmisión de los agentes patógenos de unos hospedadores a otros.
- Su enorme potencial de dispersión, firmemente aferradas a la piel de sus hospedadores.
- El potencial reproductor de las hembras, capaces de depositar cientos o miles de huevos y que posibilita un crecimiento rápido de las poblaciones de estos parásitos.
- Su capacidad para mantenerse vivas tras largos períodos de inanición (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

El mayor interés en la ecología de las garrapatas se centra en especies que tienen un papel en la transmisión de patógenos a los seres humanos. Sin embargo, cada vez hay más investigaciones sobre especies de garrapatas que pueden afectar seriamente la salud y la producción animal (Dantas-Torres y Otranto, 2013). En el caso del ganado comercial, hay una reducción significativa de la capacidad productiva del rebaño, incluyendo daños a la piel y al cuero, abortos y mortalidad (Duttmann *et al.*, 2016).

En nuestro país se han registrado 100 especies, lo que corresponde a un 11.3% de la diversidad mundial conocida (894 especies, 20 géneros y 3 familias. Los argásidos están representados por 32 especies en 5 géneros: *Argas* (6 especies), *Antricola* (3), *Ornithodoros* (20), *Otobius* (2) y *Nothoaspis* (1), mientras que los Ixodidae por 68 especies en 5 géneros: *Ixodes* (26 especies), *Amblyomma* (26), *Dermacentor* (10), *Haemaphysalis* (3) y *Rhipicephalus* (3) (Pérez *et al.*, 2014).

Actualmente los géneros con mayor riqueza son *Amblyomma* e *Ixodes*; las especies del primero están asociadas con 43 taxones de vertebrados, lo que representa al 1.9% del total de vertebrados terrestres en el país (2 306 especies). Los mamíferos son los principales hospederos seguidos por reptiles, aves y anfibios (Pérez *et al.*, 2014).

## 2.2 Ciclo de vida

El ciclo vital de los ixódidos presenta cuatro estadios (huevo, larva, ninfa y adulto); el paso de un estadio al siguiente implica la ingesta de un gran volumen de sangre de un hospedador, la digestión de la misma, introducción de cambios morfoanatómicos que concluyen con la muda del tegumento y un período más o menos largo de vida libre a la búsqueda de un

nuevo hospedador; el desarrollo del ciclo biológico de una garrapata se encuentra estrechamente relacionado con la presencia efectiva de hospedadores adecuados en su área biológica, así como con la existencia de un microhábitat en el que se den condiciones favorables; de este modo, se pueden distinguir ciclos en los que intervienen tres, dos y un único hospedador (León-Artozqui, 2012a).

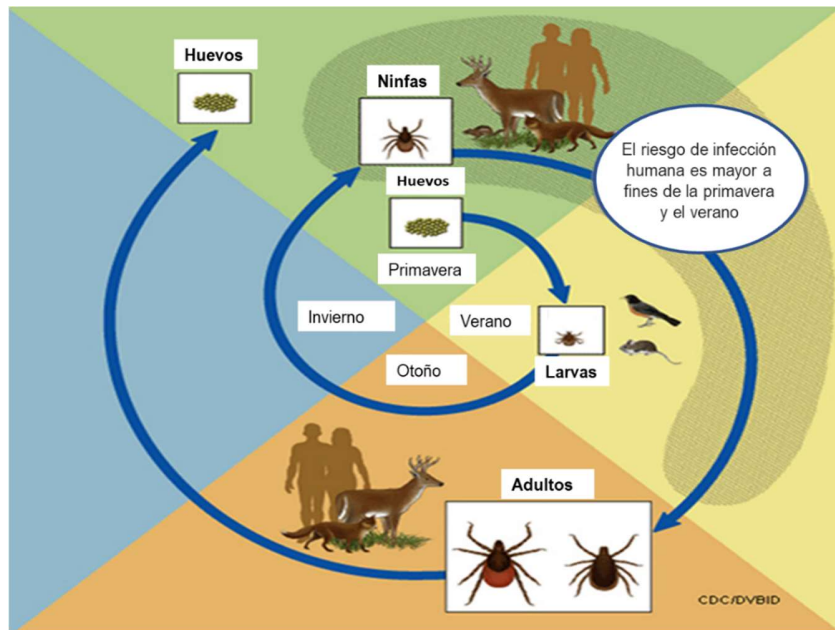
- Ciclo clásico: trifásico. Hay tres hospedadores para cada generación de garrapatas y una única fase de alimentación por estado, la cual es seguida por la caída de la garrapata al suelo y la fase de muda. El nuevo estado recién surgido espera a que un hospedador pase para continuar el ciclo de desarrollo (Fig. 1).
- Ciclo difásico. Hay dos hospedadores para cada generación de garrapatas. La larva muda a ninfa en el primer hospedador. Es el caso para algunas especies de *Rhipicephalus*.
- Ciclo monofásico. Todas las mudas se producen en el mismo hospedador. Algunas especies de *Dermacentor* siguen este ciclo (León-Artozqui, 2012a).

Los vectores importantes de enfermedades humanas son las garrapatas de tres huéspedes, la duración promedio del ciclo de vida es de 1-2 años, variando según las condiciones medioambientales. Dentro del ciclo de vida la garrapata puede adquirir el patógeno de manera horizontal (medio ambiente) o de manera vertical (hereditario). *B. microti*, *B. burgdoferi* y *A. phagocitophilum* son ejemplos de patógenos adquiridos de manera horizontal. Mientras que *R. rickettsii*, el agente causal de la fiebre de las montañas rocallosas es adquirido de manera vertical en las hembras de *Dermacentor variabilis* (Koneman y Allen, 2008).

En muchas ocasiones las ninfas se consideran el estadio más idóneo para la transmisión de enfermedades, ya que debido a su pequeño tamaño, pasan desapercibidas y pueden alimentarse sin problemas. Un alto porcentaje de las enfermedades relacionadas con garrapatas se presentan entre finales de primavera y principios de otoño por alta actividad ninfal. En la mayoría de los casos las enfermedades transmitidas por garrapatas son leves y se resuelven con un diagnóstico temprano y exacto (Koneman y Allen, 2008).

Muchas enfermedades transmitidas por vectores son zoonosis causadas por patógenos que tienen roedores como su huésped natural. Debido a que los seres humanos no son parte del ciclo

de transmisión natural, sólo se infectan incidentalmente. La zoonosis generalmente persiste en la naturaleza en ciclos de transmisión silenciosa entre los vectores y el huésped roedor, pasando sin ser detectado a menos que se derramen e infecten a la población humana (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2014).



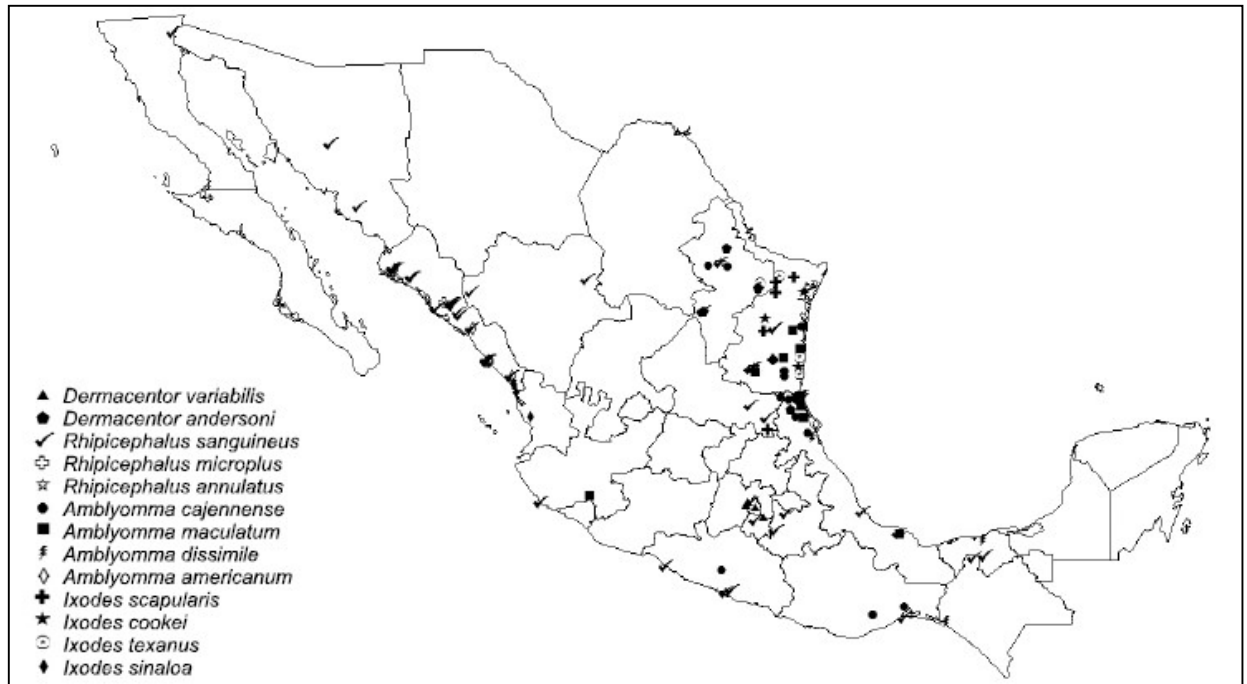
**Figura 1** Ciclo de vida de la garrapata de venado. Tomada de: <http://www.cdc.gov/lyme/transmission/index.html>

### 2.3 Distribución

La distribución y epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores es reflejo de la distribución geográfica y las actividades estacionales de los vectores, reservorios, cuidado animal y comportamiento humano (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2015).

En la Fig. 2 se muestra la distribución de especies de garrapatas en el país, donde se encontró que *R. sanguineus* fue la garrapata más frecuente, representando más del 52,2% de todas las garrapatas en todas las regiones de México. Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que *R. sanguineus* se considera una garrapata global capaz de transmitir patógenos como *R. rickettsii*, especies de *Ehrlichia* e incluso *Leishmania infantum* (Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2015).





**Figura 2** Distribución de las especies de garrapatas en la república mexicana, Tomada de: Sosa-Gutiérrez *et al.* (2015)

## 2.4 Principales enfermedades transmitidas por garrapatas

En la tabla 1 se resumen los algunos de los principales patógenos transmitidos por garrapatas que se tomaron en cuenta para este estudio. Las especies de garrapatas también transmiten arbovirus, siendo el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas el más notorio en términos de salud pública en Europa. Además del TBEV, se sabe que muchos otros virus son transmitidos por garrapatas (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015).

**Tabla 1** Principales enfermedades transmitidas por garrapatas modificada de: León-Artozqui (2012b); Vayssier-Taussat *et al.* (2015).

Patógenos	Vector	Distribución	Reservorios
<b><i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i></b>	<i>Ixodes</i> spp.	USA: nordeste, medio oeste superior, costa del Pacífico, Norte de Europa, Europa Central, Asia	Roedores, aves, reptiles
<b><i>Anaplasma</i> spp.</b>	<i>Ixodes</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	USA: nordeste, medio oeste superior, costa del Pacífico Europa central, Sudamérica, África	Rumiantes salvajes, roedores
<b><i>Ehrlichia</i> spp.</b>	<i>R. sanguineus</i> <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Amblyomma americanum</i>	Sur de Europa, medio oriente, África, Sudeste asiático, USA: sudeste y parte sur-central:	Perros
<b><i>Babesia</i> spp.</b>	<i>Ixodes</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp. <i>R. sanguineus</i> <i>Haemaphysalis</i> spp.	Regiones tropicales, subtropicales y mediterráneas África subsahariana, Sudáfrica USA Asia (Japón)	Ganado, venado, perros roedores
<b><i>Rickettsia</i> spp.</b>	<i>Ixodes</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp. <i>R. sanguineus</i>	Latinoamérica América central y Sudamérica, Sur de Europa, África, medio oriente, India, Asia USA,	Perros

En México, por la diversidad de su flora y fauna hace que se presenten condiciones propicias para el desarrollo de enfermedades transmitidas por garrapatas. En el país se ha reportado una seroprevalencia de la fiebre Q se reportó en 28% en vacas lecheras, 10% en bovinos, 35% en cabras y 40% en ovinos (Salinas-Meléndez *et al.*, 2002).

En el año 2003, la seroprevalencia de *B. burgdorferi* en la población general del noreste de la República Mexicana fue del 6.3%. La presencia de garrapatas *Ixodes* y *Amblyomma* infectadas en el noreste de México sugiere que esta es una zona endémica de enfermedad de Lyme y que representa un riesgo de transmisión de *B. burgdorferi* al humano (García-Meléndez *et al.*, 2014) y se reportaron garrapatas positivas de los géneros *Ixodes* y *Amblyomma*, mediante PCR, para *B. burgdorferi sensu stricto* en la vegetación y hospederos intermediarios, como lo son las ardillas y ratones del noreste de México (Vargas *et al.*, 2007).

En el caso de la anaplasmosis bovina los estudios serológicos y moleculares en el país han mostrado esta enfermedad en más del 50% de todo el ganado muestreado y en más del 75% de todos los bovinos que se encuentran dentro de las regiones tropicales y subtropicales, lo que

comprende todo el Golfo de México, la península de Yucatán, una gran parte de la costa del Pacífico y la parte más meridional de la península de California (Rodríguez *et al.*, 2009)

Por otro lado, la fiebre manchada de las montañas rocosas (Rocky Mountain spotted fever) se ha reportado en los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Durango, Coahuila, y Yucatán; siendo el estado de Baja California el que ha reportado el más alto índice de defunciones por *Rickettsia rickettsii*, estos reportes comprenden los estados de Mexicali, Tijuana, el puerto de Ensenada y el poblado de Vicente Guerrero (Parola *et al.*, 2013).

*E. chaffeensis* se detectó en el 5.5% de roedores *Peromyscus* spp., por lo que la presencia de este patógeno en hospederos salvajes es evidencia de un ciclo de garrapatas y vertebrados lo que representa un riesgo potencial para los seres humanos. Hasta ahora no se reportan casos fatales de HME en el país, pero pueden estar siendo ignorados por los médicos y representar una verdadera emergencia de la enfermedad en México (Sosa-Gutierrez *et al.*, 2016).

## 2.5 Enfermedad de Lyme

A principios del siglo XX, Benjamín Lipschutz y Arvid Afzelius hicieron las primeras descripciones del eritema crónico migrans (ECM), que ahora se sabe que es la manifestación inicial en la piel de la borreliosis de Lyme, en Europa, Afzelius describió la asociación de las lesiones de ECM con la mordedura de una garrapata en 1910 (García-Meléndez *et al.*, 2014).

Más tarde Steere en 1975 realizó la evaluación epidemiológica de 39 niños y 12 adultos de los pueblos de Old Lyme, Lyme y East Haddam, que desarrollaron hinchazón asimétrica recurrente y dolor en unas pocas articulaciones grandes, la mayoría en la rodilla, condujo a la completa descripción de la infección y su asociación con el vector (Gaumond *et al.*, 2006).

En 1982, Burgdorfer aisló el microorganismo causal que se encontraba dentro del tracto gastrointestinal de la garrapata *Ixodes*, concluyendo que se trataba de una espiroqueta, sobre la base de las características ultraestructurales y el análisis del ADN, la espiroqueta de la enfermedad de Lyme fue identificada como miembro del género *Borrelia*, y recibió el nombre de *B. burgdorferi* en honor a su descubridor (García-Meléndez *et al.*, 2014).

La enfermedad de Lyme causa una amplia gama de síntomas en seres humanos, incluyendo una erupción anular (eritema migrans), síntomas de artritis, gripe, y síntomas neurológicos, incluyendo parálisis del nervio facial (Gaumond *et al.*, 2006).

Los pacientes con la infección pueden cursar sin síntomas o padecer manifestaciones cardíacas, articulares, cutáneas o neurológicas; sin embargo, la ausencia de datos patognomónicos y lo inespecífico de alguno de sus síntomas causa confusiones con otros diagnósticos, como fibromialgia y síndrome de fatiga crónica (Skinner *et al.*, 2007).

El diagnóstico clínico es difícil, ya que un elevado número de enfermos no recuerdan el antecedente de la mordedura de garrapata, y hasta en un 50 % de los afectados tampoco aparece la lesión cutánea característica denominada eritema migrans, y las fases posteriores de la enfermedad se caracterizan por la inespecificidad de los signos y síntomas (Tabla 2), además la mayoría de las infecciones son subclínicas (Miranda *et al.*, 2009).

**Tabla 2** Clasificación clínica de la enfermedad de Lyme, tomada de: Portillo *et al.* (2014)

<b>Fase precoz localizada</b>	<b>Presencia de EM o linfadenosis benigna cutis con o sin linfadenopatía u otros signos o síntomas</b>	<b>ESTADIO I</b>
<b>Fase precoz diseminada</b>	Presencia de EM múltiple y/o manifestaciones neurológicas, cardíacas o articulares agudas	<b>ESTADIO II</b>
<b>Fase crónica</b>	Presencia de ACA, neuroborreliosis terciaria o artritis persistente o recidivante de al menos 6 meses de duración.	<b>ESTADIO III</b>
<b>ACA: acrodermatitis crónica atrófica; EM: eritema migratorio.</b>		

### 2.5.1 Agente etiológico

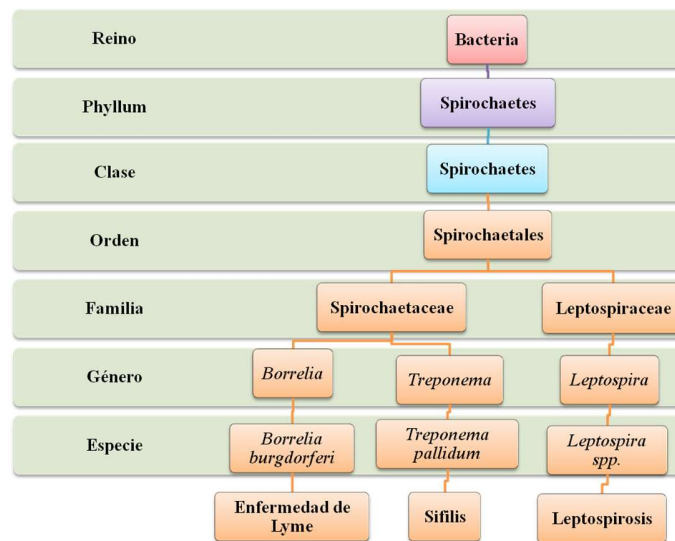
La borreliosis de Lyme es causada por varias especies estrechamente relacionadas que se conocen colectivamente como *B. burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi* en sentido general). La infección humana es causada principalmente por 3 genoespecies patógenas: *B. burgdorferi sensu stricto* (*B. burgdorferi* en sentido estricto), *B. garinii*, y *B. afzelii*; *B. burgdorferi* es la única causa de la infección en los Estados Unidos; las 3 genoespecies se encuentran en Europa, y las últimas 2 especies se encuentran en Asia (Steere, 2006).

Las bacterias del género *Borrelia* pertenecen al orden de los *Spiroquetaceae*. Las espiroquetas son organismos filamentosos extraordinariamente largos y flexibles y con una forma característica en espiral. Las especies del género *Borrelia* son microaerófilas, móviles y se transmiten por medio de un vector artrópodo, característica fundamental que las distingue de otros géneros como *Treponema* y *Leptospira* (Fig.4) (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005).

El genoma completo de la cepa B31 de *B. burgdorferi* s.s. es de aproximadamente 1.5 Mb, y comprende un cromosoma lineal de 950 kb y 9 plásmidos circulares y 12 lineales; las características más importantes de este genoma residen en el gran número de secuencias que codifican lipoproteínas, incluyendo las proteínas de envuelta externa (Osp's, del inglés *Outer Surface Proteins*) OspA hasta OspF6, así como la elevada cantidad de pseudogenes (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005). También tiene pocas proteínas para actividad biosintética y depende de su hospedero para muchos de sus requerimientos nutricionales; no tiene secuencias reconocidas para toxinas (Steere, 2006).

*Borrelia* tiene la habilidad única de poder sobrevivir en ambientes sin hierro, a pesar de que este es una limitante para muchas bacterias patógenas; este hecho es causado por la eliminación de la mayoría de las metaloproteínas dependientes de Fe y la sustitución por magnesio en las restantes. Otra característica típica, que no se ha entendido claramente hasta ahora son las formas no helicoidales; varias formas císticas, de “ampolla” y en L se han descrito repetidamente durante su cultivo en medios con pH no óptimo en ausencia de suero, presencia de antibióticos y cultivos viejo, es decir, en general bajo condiciones de estrés; se ha observado que al menos algunas de estas transformaciones son reversibles; se ha propuesto que estas alteraciones son significativas en la patogénesis, evasión inmune y/o resistencia a antibióticos de por lo menos *B. burgdorferi* s. s (Krupka *et al.*, 2007).

A excepción de *B. crocidurae* y *B. hispanica*, el resto de estas borrelias son cultivables, aunque en ocasiones necesiten condiciones especiales de crecimiento, crecen en medio líquido Barbour-Stoenner-Kelly II15 a 30-34 °C en ambiente microaerófilo y se dividen cada 8-12 h durante la fase logarítmica de su crecimiento (Escudero-Nieto y Guerrero-Espejo, 2005).



**Figura 3.** Taxonomía de *Borrelia burgdorferi*. Karami (2012)

### 2.5.2 Patogénesis

Las borrelias tienen que ser capaces de adherirse y sobrevivir en el intestino de la garrapata, pasar a la hemolinfa y transportarse a través de las glándulas salivares al flujo sanguíneo del hospedero, evitar la reacción inmune y diseminarse a los órganos diana. En todo este proceso tienen un papel importante varias proteínas de membrana externa y proteínas adhesivas (Rodríguez-González, 2013).

En garrapatas sin alimentar, las espiroquetas expresan la proteína OspA, que se une a su receptor TROSPA asegurando que se adhiera la bacteria; durante la alimentación de las garrapatas, aproximadamente de 24 a 48 horas después de la unión, *Borrelia* regula a la baja OspA, y expresa OspC y migra a las glándulas salivales; en este punto OspC une a una proteína de la glándula salival de garrapata de 15 kDa (Salp15), protegiendo la espiroqueta de la respuesta del hospedero (Coumou *et al.*, 2011).

Algunos de los plásmidos de *B. burgdorferi s. s* no son esenciales para su crecimiento *in vitro* y pueden perderlos fácilmente cuando pasan a través de su hospedero natural; sin embargo algunos de estos genes son necesarios durante el curso natural de la infección y para la permanencia de *Borrelia* en su hospedero; además los plásmidos lineales tienen características similares al cromosoma linear lo que respalda la idea que al menos algunos plásmidos de *B. burgdorferi s. l.* deben ser considerados como “microcromosomas” (Krupka *et al.*, 2007).

En la borreliosis de Lyme el hombre es un hospedero accidental, para la transmisión de esta enfermedad es necesario que la garrapata infectada se mantenga adherida a la piel por un período de no menos de 24 horas. La puerta de entrada es la piel, la diseminación es cutánea, linfática y hematógena. No se conoce que existan diferencias genéticas en humanos relacionadas con la susceptibilidad para la infección y es también desconocido cómo puede desarrollarse inmunidad protectora adquirida, por otra parte, no se han reportado casos de reinfección (Herrera-Lorenzo *et al.*, 2011).

### **2.5.3 Distribución**

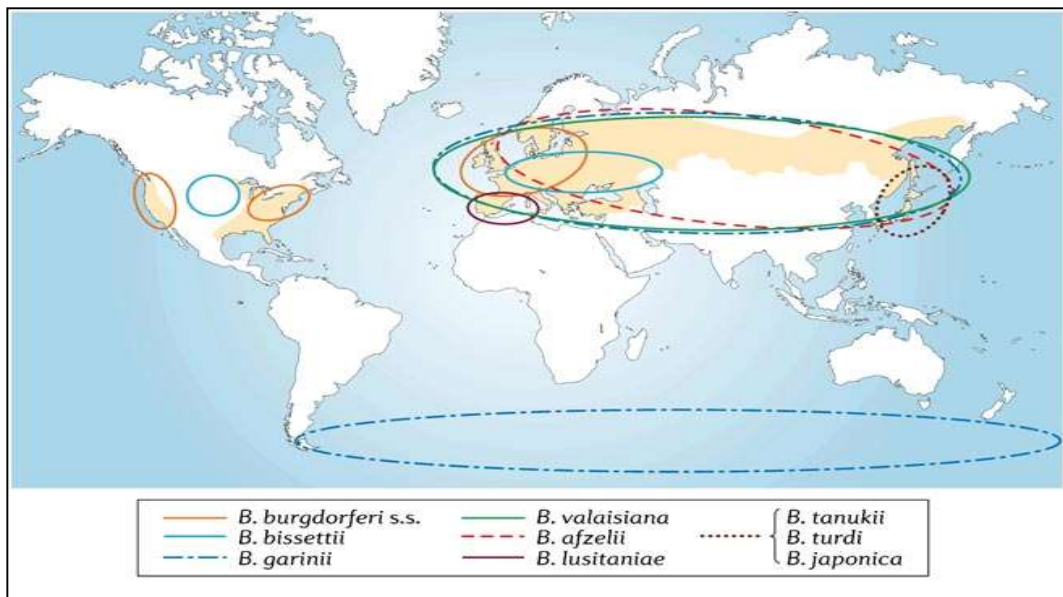
En los Estados Unidos de América (EUA) y en Europa, la borreliosis de Lyme representa 90% de las infecciones transmitidas por garrapatas. La enfermedad es endémica en la mayoría de los países europeos, en tres zonas enzoóticas de EUA y también en algunos países asiáticos. En Europa la prevalencia de la infección evaluada con pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA) o inmunofluorescencia (IFA) es de 8 a 27%<sup>2</sup> y en EUA varía de 1 a 10% (Vargas *et al.*, 2007).

En el año 2003 la seroprevalencia de *B. burgdorferi* en la población general del noreste de la República Mexicana fue del 6.3%. La presencia de garrapatas *Ixodes* y *Amblyomma* infectadas en el noreste de México sugiere que esta es una zona endémica de enfermedad de Lyme y que representa un riesgo de transmisión de *B. burgdorferi* al humano (García-Meléndez *et al.*, 2014).

## **2. Rickettsiosis**

Estas zoonosis se encuentran entre las enfermedades transmitidas por vectores conocidas más antiguas. Sin embargo, en los últimos 25 años, el alcance y la importancia de los patógenos rickettsiales asociados a las garrapatas han aumentado dramáticamente, haciendo de este complejo de enfermedades un paradigma para la comprensión de las infecciones emergentes y reemergentes (Parola *et al.*, 2013).

Las rickettsiosis han tenido gran trascendencia a lo largo de la historia, como es el caso del tifus exantemático que, si bien parece controlado, sigue siendo una amenaza en el contexto de guerras, desastres naturales o cualquier circunstancia que propicie falta de higiene o alteraciones medioambientales (Abarca y Oteo, 2014).



**Figura 4** Distribución geográfica de la enfermedad de Lyme y genospecies de *B. burgdorferi*. Tomada de: Kurtenbach *et al.* (2006).

En Latinoamérica, a pesar de que existen muy buenas descripciones de estas afecciones en la primera mitad del siglo pasado, se puede decir que ha existido un vacío posterior en su estudio y descripción, hasta hace escasos años (Abarca y Oteo, 2014).

Según el Dr. Nicolás León, el tifo ha existido en México desde antes de la conquista, ya que responsabiliza a esta enfermedad como la causante de la destrucción del reino de Tollan ocurrida en el año 116 D.C., así como la causante de la migración de la ciudad de Huehuetlapallan, Capital y sede de la Corte de los Chichimecas seguido a una hambruna en 583 D.C. A partir de 1570 muchos médicos se dieron a la tarea de investigar a fondo acerca de esta enfermedad dando como resultado la publicación de libros o capítulos acerca de esta rickettsiosis en distintos libros o tratados de medicina. Los estudios de las enfermedades rickettsiales en México inician el Siglo XXI con el reporte en el año 2000 de tres casos humanos de rickettsiosis causada por *R. felis* en Yucatán (Abarca and Oteo, 2014).

La similitud de los signos y síntomas de las rickettsiosis con otras enfermedades hace que se subestime el impacto de esta enfermedad en la población de todo el país. Las condiciones ecológicas, de sanidad, de cultura, y costumbres, así como la presencia de reservorios y vectores



potenciales de las distintas especies de *Rickettsia* presentes, hacen del territorio mexicano un nicho ecológico adecuado para el ciclo de transmisión de la enfermedad. El reconocimiento de las rickettsiosis como problema potencial de salud, y su inclusión dentro del diagnóstico diferencial de enfermedades exantemáticas y febriles, constituye el primer paso hacia el control de ésta enfermedad que amenaza la vida de la población mexicana (Peniche-Lara *et al.*, 2015).

### **2.6.1 Agente etiológico**

El género *Rickettsia* está constituido por diferentes especies de bacterias gramnegativas y se encuentra dentro de la familia *Rickettsiaceae* (que además incluye a *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Bartonella*). Todas las especies del género tienen en común la necesidad de ser parásitos intracelulares, su corta viabilidad fuera de los reservorios y vectores que infectan, y la dificultad para ser cultivadas en el laboratorio. Su ciclo vital salvaje se mantiene al infectar distintas especies de hospedadores (en general mamíferos) y vectores (en general garrapatas y pulgas) y a excepción de *R. prowazekii*, el ser humano constituye tan sólo un huésped accidental.

La clasificación más utilizada es la que divide las rickettsiosis en dos grupos: el de las fiebres manchadas y el de las fiebres tíficas. Las especies, áreas geográficas, hospedadores, vectores y entidades clínicas que producen se detallan en la tabla 3 (Bernabeu-Wittel y Segura-Porta, 2005).

### **2.6.2 Patogénesis**

La patogenia es muy similar en todas las especies de *Rickettsia*, y consiste en una vasculitis de pequeño vaso por infección directa de las células endoteliales, que origina un infiltrado linfohistiocitario perivascular.

**Tabla 3** Clasificación y características clínico-epidemiológicas de las especies de *Rickettsia* de mayor interés clínico. Tomada de: Bernabeu-Wittel y Segura-Porta (2005).

Agente causal	Entidad clínica	Vector	Hospedador	Distribución geográfica	Escara	Exantema
<b>Grupo de fiebres manchadas</b>						
<i>R. felis</i>	≅ Tifus murino	Pulga del gato	Perro, gato y otros mamíferos peridomésticos	América, sur de Europa (probablemente universal)	No	Tenue maculopapuloso
<i>R. slovaca</i>	TIBOLA*	Garrapata	Diferentes mamíferos salvajes y domésticos	Europa	Si	Eritema local
<i>R. rickettsii</i>	Fiebre de las Rocosas	Garrapata	Roedores y perro	América	No	Maculopapuloso afectando palmas y plantas
<i>R. akari</i>	Viruela rickettsiósica	Ácaro	Ratón	Norteamérica, Ex Unión Soviética, África, Asia	Si	Vesicular
<b>Grupo de fiebres tíficas</b>						
<i>R. typhi</i>	Tifus murino	Pulga de rata	Rata	Universal	No	Maculopapuloso sin afectar palmas ni plantas
<i>R. prowazekii</i>	Tifus epidémico	Piojo corporal	Ser humano	África, Sudamérica	No	Maculopapuloso sin afectar palmas ni plantas
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Tifus de los matorrales	Ácaro	Roedores	Sudeste asiático, Oceanía	No	Maculopapuloso sin afectar palmas ni plantas

\*Hace referencia a la denominación utilizada en la actualidad para describir el cuadro clínico (linfadenopatía transmitida por garrapatas).

Las rickettsias, al contactar con las células endoteliales, inducen su propia fagocitosis y en este sentido, la internalización rickettsial en la célula huésped es bastante rápida y eficiente. Por microscopía electrónica de transmisión se mostró que, en tan solo 3 minutos, casi el 60% de las rickettsias ya se habían adherido a la membrana celular, y de las cuales el 40% ya se habían internalizado, a los 6 min postinfección, el 60% de las bacterias fueron internalizadas en la célula huésped, mientras que, a los 12 minutos, el 90% fueron internalizadas. Una vez dentro del citosol, escapan del fagosoma y proliferan por fisión binaria simple, siendo finalmente expulsadas por exocitosis para seguir infectando células contiguas. La infección se inicia en la

zona de inoculación, y posteriormente se extiende célula a célula y por la circulación venosa, lo que finalmente produce vasculitis multisistémica (Bernabeu-Wittel y Segura-Porta, 2005; Schroeder *et al.*, 2016).

El análisis del genoma rickettsial ha identificado una familia de genes auto transportadores denominados antígeno de células superficiales (sca). Estos se identifican como sca0 a sca16

Sca0, más comúnmente conocido como rompA por rickettsial outer membrane protein A, está codificada en la mayoría de las Rickettsias del grupo de fiebre manchadas, pero el gen funcional está ausente en el grupo de tifus (*R. prowazekii* y *R. typhi*). El tamaño de la proteína correspondiente varía con la especie rickettsial. La evidencia sugiere que sca0 codifica para una proteína de adhesión.

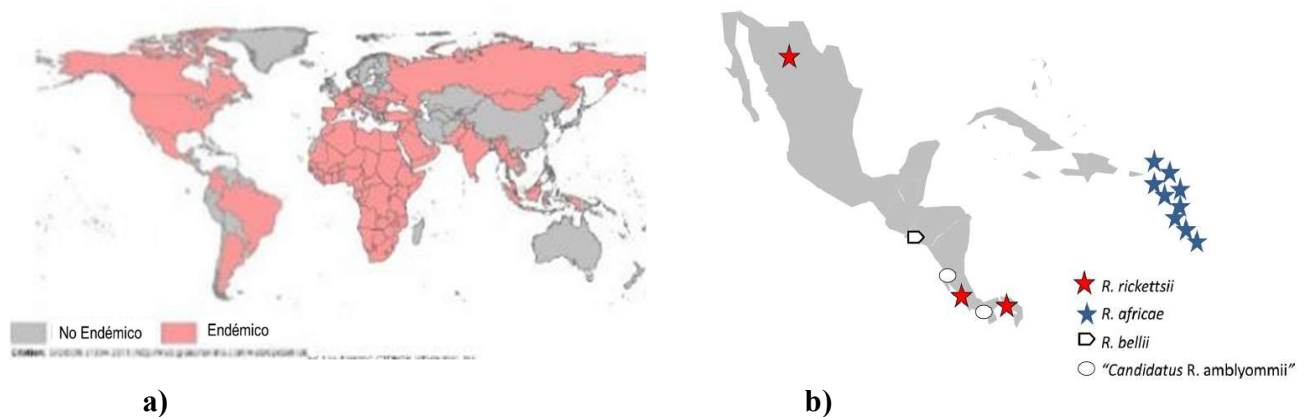
Mientras sca0 sólo se encuentra en el grupo de Rickettsias de fiebre manchadas, Sca5, más comúnmente conocido como rompB, está presente en todo el género *Rickettsia* excepto *R. canadensis*. Como antígeno celular de superficie, es la proteína más predominante en la capa superficial proteínica de la pared celular rickettsial y muestra un alto grado de conservación (70-95%) entre las especies rickettsiales, lo que sugiere una función universal dentro del género. La evidencia sugiere que OmpB es también suficiente para la adhesión y la invasión en las células huésped (Schroeder *et al.*, 2016).

### 2.6.3 Distribución

Actualmente, desde el punto de vista de la salud pública, del grupo de las fiebres manchadas las especies de rickettsias más relevantes en Latinoamérica y el Caribe son *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. massiliae* y *R. africae* (Venzal, 2013). En la Fig.5 se muestra la distribución mundial de este grupo de rickettsias.

Focos hiperendémicos han sido descritos repetidamente en comunidades del suroeste de Estados Unidos y el norte de México, vinculados directamente a un gran número garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* infectadas con *R. rickettsii* que resultan de las poblaciones no controladas de perros callejeros. En la Fig.6 se muestra la distribución en México y Centroamérica de las principales Rickettsias. En México la fiebre manchada de las montañas rocosas (Rocky Mountain spotted fever) se ha reportado en los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Durango, Coahuila, y Yucatán; siendo el estado de Baja California el que reporta actualmente el más alto índice de defunciones a causa de rickettsiosis en la que la especie

infectante es *Rickettsia rickettsii*, especie causante de la fiebre manchada de las Montañas Rocallosas. Los reportes comprenden los estados de Mexicali, Tijuana, el puerto de Ensenada y el poblado de Vicente Guerrero (Parola *et al.*, 2013).



**Figura 5** a) Distribución de las rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas b) distribución de las principales rickettsias en México y Centroamérica Tomada de: <https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick> y Parola *et al.* (2013)

## 2.7 Anaplasmosis

Los primeros informes sobre la anaplasmosis datan de finales del siglo XIX en Sudáfrica. Sin embargo, la identidad del agente causal de la enfermedad fue descubierta hasta 1910. Para 1930, Sanborn, Stiles y Moc demostraron la transmisión mecánica de *A. marginale* por moscas de caballo (Tabanidae) y moscas de establo (*Stomoxys calcitrans*). A finales de los años ochenta, el ciclo de vida de *A. marginale* se demostró en garrapatas del género *Dermacentor* y los primeros casos de Anaplasmosis Granulocítica Humana (HGA) fueron reportados en 1994 en los Estados Unidos. Pocos años después, el primer caso de anaplasmosis humana fue descrito en Europa en un paciente de Eslovenia. Desde que se demostró de la patogenicidad para los seres humanos, surgió el interés de la comunidad científica en estas rickettsias (Dantas-Torres y Otranto, 2017).

El diagnóstico de anaplasmosis se realiza habitualmente a partir de datos epidemiológicos, de signos clínicos y de la recuperación de inclusiones intracelulares en frotis de sangre teñidos para el examen citológico. Los signos clínicos observados en la mayoría de los pacientes humanos son malestar general, fiebre, mialgia y dolor de cabeza. En algunos pacientes pueden estar involucrados los tractos gastrointestinal y respiratorio, el hígado y el sistema nervioso

central. Los hallazgos laboratoriales más frecuentes son trombocitopenia, leucopenia, anemia y aumento del nivel de transaminasas. En los bovinos, la anaplasmosis es más grave en animales con más de 2 años, siendo potencialmente mortales principalmente en infecciones por *A. marginale*. Los principales signos clínicos son fiebre, ictericia y anorexia (Dantas-Torres y Otranto, 2017).

A pesar de la asociación fuerte con la mordedura de la garrapata, HGA se puede adquirir con las exposiciones alternas *A. phagocytophilum*. Horowitz y colaboradores en 1998 describieron la HGA en una mujer durante el embarazo, su hijo desarrolló HGA ocho días después de haber nacido, y los autores argumentaron que la transmisión transplacentaria *A. phagocytophilum* había ocurrido (Bakken y Dumler, 2015).

### **2.7.1 Agente etiológico**

La Anaplasmosis es causada por bacterias del género *Anaplasma*, pertenecientes a la familia Anaplasmataceae, dentro del orden Rickettsiales. El género incluye pequeñas bacterias pleomórficas gramnegativas (aproximadamente 0,3 µm) que residen en las células del sistema fagocítico mononuclear, eritrocitos y plaquetas de huéspedes vertebrados. Estos microorganismos son difíciles de aislar en medio de cultivo y algunas especies (por ejemplo, *A. bovis* y *A. platys*) nunca han sido aisladas; generalmente, se utilizan medios de cultivo celular, tales como células de garrapatas o células de linaje hematopoyético (por ejemplo, HL-60), donde pueden mantenerse durante largos períodos (> 1 año). Estas rickettsias tienen un cromosoma circular y su el genoma es de un tamaño de  $1.2-1.5 \times 10^6$  pb y se ha determinado la secuencia completa para *A. phagocytophilum*, *A. centrale* y *A. marginale*. Actualmente existen siete especies válidas del género *Anaplasma* (Tabla 4). Pero Además de estas, se han reportado otras especies en ovejas (*A. mesaenterum*), cuya validez ha sido discutida y en venado cola blanca (*A. odocoilei*) en el norte América (Dantas-Torres y Otranto, 2017).

**Tabla 3.** Especies del género *Anaplasma*, vectores y su distribución. Tomada de: Dantas-Torres y Otranto (2017)

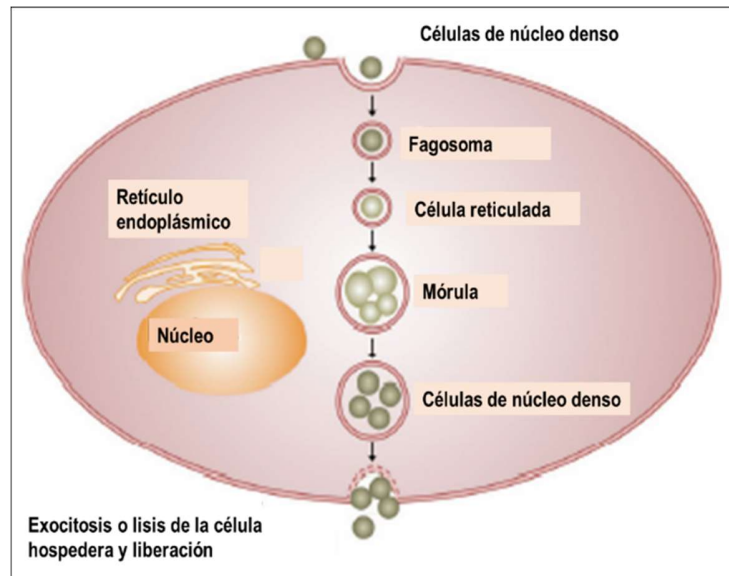
Especies	Hospedero(s) principal(es)	Géneros vectores	Distribución
<i>A. bovis</i>	Ganado, conejo	<i>Amblyomma, Haemaphysalis, Ixodes, Rhipicephalus (Boophilus)</i>	África, América, Asia.
<i>A. caudatum</i>	Ganado	Desconocido	Norteamérica
<i>A. centrale</i>	Ganado	<i>Haemaphysalis</i>	Europa, África, América, Asia.
<i>A. marginale</i>	Ganado	<i>Dermacentor, Rhipicephalus (Boophilus)</i>	Cosmopolita
<i>A. mesaenterum</i>	Oveja	<i>Haemaphysalis, Ixodes</i>	Europa
<i>A. odocoilei</i>	Venado cola blanca	Desconocido	Norteamérica
<i>A. ovis</i>	Oveja, cabra	<i>Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Ixodes, Rhipicephalus</i>	Europa, África, Norteamérica, Asia.
<i>A. phagocytophilum</i>	Humano, equinos, oveja, cabra, ganado, perro, gato roedores	<i>Ixodes, Dermacentor (?)</i>	Cosmopolita
<i>A. platys</i>	Perro, gato, hombre	Desconocido, <i>Rhipicephalus(?)</i>	Cosmopolita

### 2.7.2 Patogénesis

Mientras que otros miembros del orden de los rickettsiales escapan del fagosoma después de entrar en la célula huésped y se multiplican en el citoplasma antes de ser liberados en el ambiente extracelular, las bacterias de la familia *Anaplasmataceae* se desarrollan en una vacuola citoplasmática en la célula huésped. Estos patógenos, localizados en las glándulas salivales de la garrapata, se inoculan en la dermis del huésped vertebrado cuando la garrapata infectada se alimenta, y dependiendo de la especie de *Anaplasma* implicada, pueden infectar muchos tipos de células tales como: leucocitos, plaquetas y eritrocitos. Se definen diferentes etapas de desarrollo para las *Anaplasmataceae*, que se caracterizan por su reorganización del ADN de células de núcleo denso (forma infecciosa) a células reticuladas (forma vegetativa). Las formas reticuladas se multiplican por fisión binaria y forman mórulas, y luego se vuelven a las densas células centrales antes de ser liberadas (Fig. 6 ) (Dantas-Torres and Otranto, 2017; Pruneau *et al.*, 2014).

*Anaplasma. phagocytophilum* tiene, como su nombre indica, una preferencia a las células fagocíticas y es una de las pocas bacterias que sobreviven y se replican dentro de los neutrófilos granulocitos. Además, induce la secreción de citoquinas y sus receptores para promover la pérdida de CD162 y CD62L, e interactúa también con los ligandos de la célula huésped, mediante proteínas de superficie conocidas como adhesinas con el fin de facilitar la internalización en la célula huésped. *A. phagocytophilum* carece de lipopolisacáridos y peptidoglicanos, pero compensa la pérdida de integridad de la membrana mediante la

incorporación de colesterol que permite escapar a las vías de activación de Nod Like Receptor y Toll Like Receptor para infectar con éxito las células inmunes de vertebrados (Stuen *et al.*, 2013).



**Figura 6** Ciclo de vida intracelular de *Anaplasmatidae*. Tomada de Pruneau *et al.* (2014)

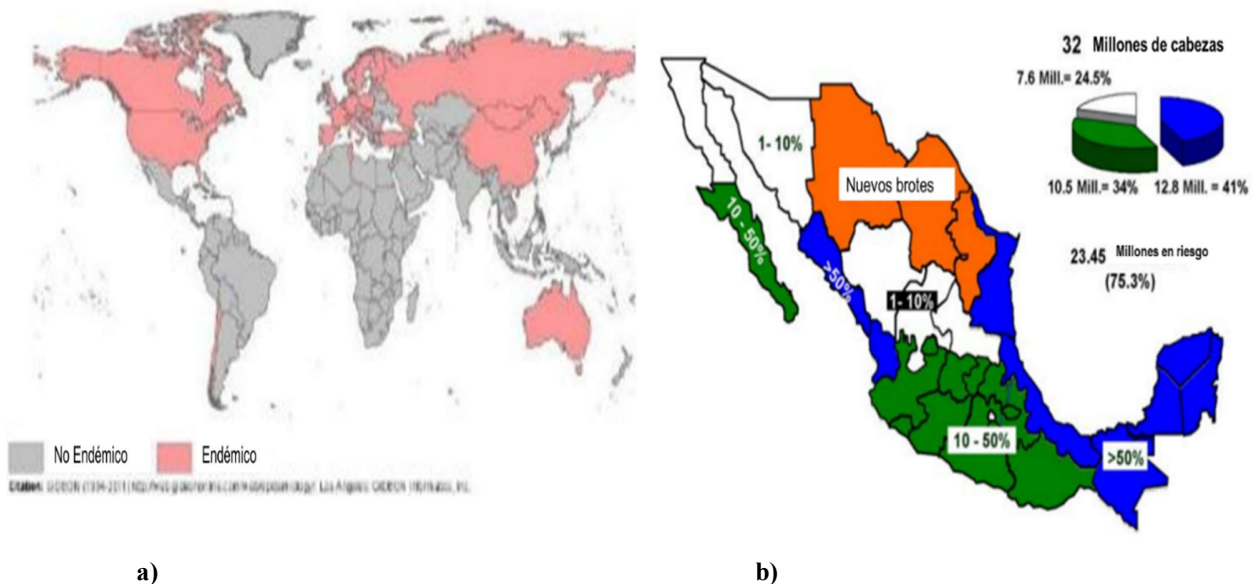
### 2.7.3 Distribución

En general, la Anaplasmosis tiene una distribución cosmopolita, aunque algunas especies de *Anaplasma* (por ejemplo, *A. caudatum* y *A. mesaenterum*) tienen aparentemente una distribución geográfica limitada. La prevalencia de la infección varía ampliamente de acuerdo con la especie de *Anaplasma*, el huésped animal, la región geográfica y la prueba utilizada (Fig. 7a) (Dantas-Torres y Otranto, 2017).

Los brotes de anaplasmosis se asocian frecuentemente a la alta infestación de garrapatas o cuando los animales de una zona no endémica se introducen en áreas de transmisión activa, lo que generalmente se relaciona con alta morbilidad y mortalidad (Dantas-Torres y Otranto, 2017).

En el caso de la anaplasmosis bovina en México (Fig. 7b), los estudios serológicos y moleculares han demostrado esta enfermedad en más del 50% del ganado muestreado ubicado en regiones tropicales y subtropicales y más del 75% de todos los bovinos que se encuentran dentro de las regiones tropicales y subtropicales que comprenden todo el Golfo de México, la

península de Yucatán, una gran parte de la costa del Pacífico y la parte más meridional de la península de California (Rodríguez *et al.*, 2009).



**Figura 7** a) Distribución de Anaplasmosis a nivel mundial y b) distribución de anaplasmosis bovina en México. Tomada de <https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick> y Rodríguez *et al.* (2009)

## 2.8 Ehrlichiosis

En 1838, en Sudáfrica se observó una enfermedad mortal de ovejas después de una severa infestación de garrapatas, que también afecta al ganado vacuno, cabras y rumiantes silvestres, fue finalmente llamada la enfermedad como “Heartwater” debido a la presencia común de derrame pericárdico y se atribuyó en última instancia a la infección por *Ehrlichia ruminantium* transmitida por *Amblyomma spp* (Little, 2017).

En abril de 1986, un médico que examinaba el frotis de sangre periférica de un paciente con presunta fiebre maculosa de las Montañas Rocosas descubrió mórulas parecidas a las de *E. canis* conocida únicamente como patógeno de importancia veterinaria. La bacteria patógena fue formalmente denominada *E. chaffeensis* y enfermedad causada esta se denominó ehrlichiosis monocítica humana (HME) porque las principales células diana de este patógeno son monocitos (Yu y Walker, 2016).



Se ha reportado que todas las especies ehrlichiales excepto *E. muris* causan infección en humanos, lo que puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como la ehrlichiosis monocítica humana (HME) causada por *E. chaffeensis* por lo que causa preocupaciones significativas tanto para la salud pública (Saito *et al.*, 2015).

El determinante más importante en el diagnóstico de la ehrlichiosis monocítica humana es la sospecha clínica. La ehrlichiosis humana generalmente se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza intenso y malestar general, mialgia y trastornos gastrointestinales a menudo están presentes, además de estos síntomas, la pancitopenia es una importante anomalía hematológica que se asocia con frecuencia a esta enfermedad. Los signos neurológicos, incluyendo la confusión, se desarrollan en aproximadamente el 20% de los pacientes, y en los casos severos, la dificultad de respirar y diátesis de sangrado se informan. Las tasas de letalidad se estiman en 2-3% (Hilal y Snapp, 2015; Little, 2017).

La ehrlichiosis causada por *E. chaffeensis* ha aumentado más en pacientes inmunosuprimidos como una consecuencia inevitable de las fuerzas ambientales que incrementan el riesgo de exposición a estos patógenos, junto con cambios dramáticos en la demografía humana y la distribución geográfica de los casos de SIDA (Paddock y Childs, 2003).

### **2.8.1 Agente etiológico**

La erlichiosis es causada por bacterias gram negativas intracelulares obligadas del género *Ehrlichia* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*), comprenden hasta el momento seis especies (Tabla 5) (Little, 2017).

Las descripciones por microscopia óptica se basan en la observación del patógeno en leucocitos y tejidos humanos o en líneas celulares de mamíferos, en dichos ambientes, estas bacterias pequeñas e inmóviles crecen en vacuolas citoplasmáticas derivadas de un endosoma temprano, lo que forma agregados bacterianos llamados mórulas, que por microscopio óptico se observan como inclusiones en forma de mora de color azul oscuro a morado con la tinción de Romanovsky; se pueden reconocer 2 tipos de células morfológicamente diferentes: células reticulares (formas coccoide y cocobacilar con ribosomas y fibrillas de ADN uniformemente dispersas a lo largo del citoplasma), y células de núcleo denso (forma coccoide con ADN centralmente condensado y ribosomas). Las células reticuladas miden 0,4 a 0,6  $\mu$ m por 0,7 a 1,9  $\mu$ m y las células de núcleo denso miden 0,4 a 0,6  $\mu$ m de diámetro. Ambos tipos de células se replican por fisión binaria y ambos demuestran una pared celular, caracterizada por una

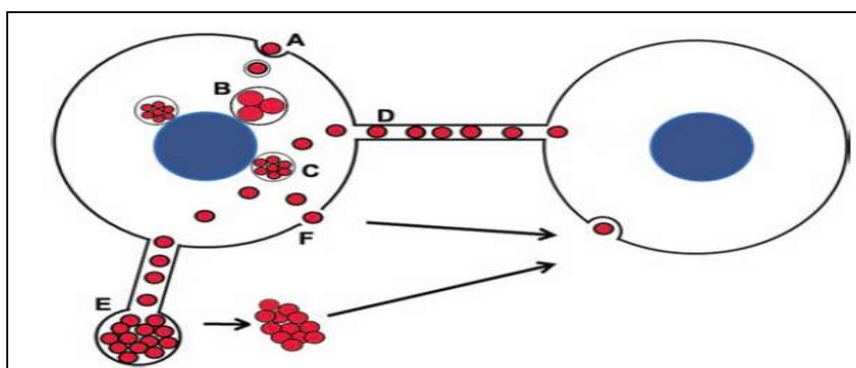
membrana citoplasmática de contorno liso y una membrana externa generalmente ondulada, separada por un espacio periplásmico. En el cultivo de células y las células humanas infectadas, las mitocondrias de la célula huésped con frecuencia están cerca de a los márgenes de mórulas (Paddock y Childs, 2003).

**Tabla 4.** Principales especies de *Ehrlichia*. Tomada de Little (2017)

Especies	Principal hospedero vertebrado	Vector(es) primario(s)	Distribución geográfica
<i>E. canis</i>	Perro	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cosmopolita
<i>Ehrlichia</i> parecida a <i>E. canis</i>	Gato	Desconocido	Norteamérica (E.U.)
<i>E. chaffeensis</i>	Venado cola blanca	<i>Amblyomma americanum</i>	Norteamérica (E.U.)
<i>E. ewingii</i>	Perro, venado cola blanca	<i>Amblyomma americanum</i>	Norteamérica (E.U.)
<i>E. mineirensis</i>	Ganado (presuntivo)	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Sudamérica (Brasil)
<i>E. muris</i>	Ratón	<i>Ixodes spp.</i>	Asia (Japón), Norteamérica (E.U.)
<i>Ehrlichia</i> parecida a <i>E. muris</i>	Ratón	<i>Ixodes scapularis</i>	Norteamérica (E.U.)
<i>E. ruminantium</i>	Rumiantes	<i>Amblyoma spp.</i> (varios)	África, Caribe

## 2.8.2 Patogénesis

El desarrollo de modelos murinos de ehrlichiosis ha facilitado enormemente la comprensión de la patogénesis y de los mecanismos de defensa del huésped contra estas infecciones. *Ehrlichia* sobrevive y se replica exclusivamente dentro de inclusiones en monocitos y macrófagos, que son células efectoras primarias de defensa antimicrobiana, por lo que debe convertir el ambiente de inclusión hostil a un ambiente propicio para su supervivencia y replicación. En general, los microorganismos pueden diseminarse después de la lisis de las células huésped a través de la muerte celular necrótica o apoptótica, o propagándose de célula a célula. El diagrama esquemático del ciclo intracelular de *Ehrlichia* se muestra en la Fig. 8 (Sunil, 2016).



**Figura 8** Ciclo intracelular de *Ehrlichia* spp. Tomada de Sunil (2016)

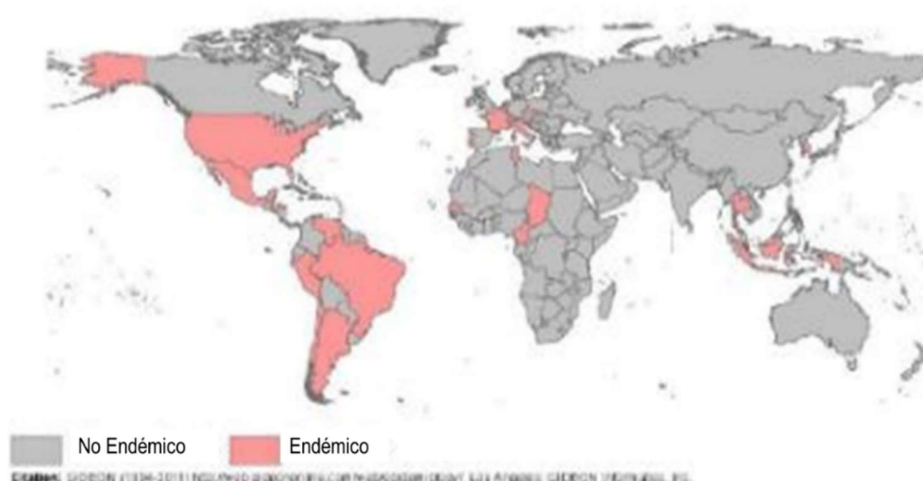
Una vez que las bacterias patógenas son capturadas, estas se replican y sobreviven dentro de un endosoma que no se fusiona con el lisosoma, escapando así a la destrucción (A). Una célula única de *Ehrlichia* puede dividirse y formar grandes células reticuladas pleomórficas (B), que a su vez se dividen y forman las células densas (C). Una vez que las densas células son extraídas de la mórula, pueden inducir la formación de filopodios en las células huésped (D). El filopodio se une a las células vecinas y el patógeno pasa a través del filopodio a las células vecinas. Si no hay células vecinas en la vecindad inmediata, el final del filopodio forma una estructura en forma de abanico lleno del patógeno (E). Estas estructuras en forma de abanico podrían separarse más tarde y el grupo de células ehrlichiales podría infectar células huésped vecinas. Cuando las células huésped se llenan con los patógenos ehrlichiales, podrían romper la membrana de la célula huésped y las células bacterianas liberadas (F) (Sunil, 2016).

### 2.8.3 Distribución

La ehrlichiosis humana se ha descrito de pacientes en las Américas, África y Asia (fig.9) y se atribuye a la infección con una variedad de diferentes especies de *Ehrlichia*. En Sudamérica, la etiología y la epidemiología de la ehrlichiosis humana son menos claras. *Ehrlichia canis* se ha documentado en algunos casos de enfermedad humana, pero también se sospecha que *E. chaffeensis* y *E. ewingii* causan enfermedad febril transmitida por garrapatas en las personas y nuevos agentes también pueden estar involucrados (Little, 2017).

La incidencia máxima de ehrlichiosis está estrechamente ligada al momento de la actividad de la garrapata. La mayoría (70%) de los casos de ehrlichiosis humana debida a *E. chaffeensis* se informan en mayo, junio y julio cuando las garrapatas vectoriales *A. americanum* son más activas (Little, 2017).

*E. chaffeensis* se detectó en el 5,5% de roedores *Peromyscus* spp recolectados en México, la presencia de este patógeno en hospederos salvajes es evidencia de un ciclo de garrapatas y vertebrados lo que representa un riesgo potencial para los seres. Hasta ahora no se reportan casos fatales de HME en el país, pero pueden estar siendo ignorados por los médicos y representar una verdadera emergencia de la enfermedad en México (Sosa-Gutierrez *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Distribución geográfica de Ehrlichiosis monocítica humana. Tomada de: <https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick>

## 2.9 Babesiosis

*Babesia* es uno de los hemoparásitos más comunes en el mundo, después de los tripanosomas, tienen una amplia gama de hospederos que incluyen centenares de especies de mamíferos y un número limitado de aves (Yabsley y Shock, 2013).

En 1888, Víctor Babeş, tratando de identificar la causa de una grave enfermedad febril responsable de la muerte de 30.000-50.000 bovinos en Rumania, identificó pequeños microorganismos cocóides dentro de los eritrocitos de los bovinos enfermos, a los que llamó "hematococo" 1889. El primer caso de babesiosis humana en Norteamérica, fue diagnosticado en un paciente esplenectomizado de California (EE. UU.) en 1966 (Dantas-Torres *et al.*, 2017).

La babesiosis humana se caracteriza por una condición clínica similar a la observada en la malaria. Esto implica signos clínicos no específicos como fatiga, letargo, anorexia, mialgia,

náusea, dolor de cabeza, sudores nocturnos, temblores, dolor abdominal, labilidad emocional, depresión, hematuria, hepatomegalia, y esplenomegalia. En laboratorio los hallazgos observados en el curso de la babesiosis son inespecíficos y tienen un valor diagnóstico limitado, en general, los animales infectados con *Babesia* spp. Presentan anemia regenerativa, reticulocitosis, recuento leucocitario anormal, aumento de las proteínas séricas. En la babesiosis humana, la anemia (hemolítica) varía de leve a moderadamente grave, con un alto recuento de reticulocitos, trombocitopenia, altos niveles de urea y creatinina en el suero y proteinuria. Un diagnóstico definitivo para la infección por *Babesia* spp. se realiza utilizando métodos directos tales como el examen citológico de frotis de sangre teñidos. El tratamiento de la babesiosis animal suele llevarse a cabo con fármacos como el dipropionato de imidocarb y diaceturato de diminazeno, mientras que para los seres humanos, pueden usarse diferentes combinaciones de fármacos (Dantas-Torres *et al.*, 2017)

La tasa de letalidad de la babesiosis humana puede variar desde el 5% en los Estados Unidos hasta el 42% en Europa, particularmente cuando el diagnóstico y el tratamiento no se realizan correctamente. Los casos humanos causados por *B. divergens* suelen ser fatales en personas esplenectomizadas, mientras que esta especie parece ser normalmente apatogénica para los seres humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2017).

### **2.9.1 Agente etiológico.**

*Babesia* son parásitos transmitidos por garrapatas del Phylum Apicomplexa, los géneros estrechamente relacionados, *Theileria* y *Cytauxzoon*, también son transmitidos por garrapatas, y colectivamente estos tres géneros se denominan piroplasmas. Muchas especies de piroplasmas son patógenos significativos. Los Apicomplexa también incluyen otros patógenos de importancia veterinaria y médica como *Plasmodium* spp. (Agentes causantes de la malaria), *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp., *Isospora* spp. y *Toxoplasma gondii*. Diferentes especies de *Babesia* pueden infectar animales domésticos, algunas estas especies son responsables de graves pérdidas en la industria ganadera en todo el mundo. La babesiosis humana es causada principalmente por *B. microti* y *B. duncani* en los Estados Unidos, mientras que la mayoría de los casos en Europa son causados por *B. divergens* y *B. venatorum*. En la tabla 6, se muestran las especies de *Babesia* de importancia médico-veterinaria (Yabsley y Shock, 2013).

Morfológicamente, las babesias son pleomórficas, pero normalmente se ven como inclusiones piriformes de intraeritrocitos. Dependiendo del tamaño de las formas intraeritrocíticas, las babesias se clasifican como "babesias grandes" (2,5-5,0  $\mu\text{m}$ ) o "babesias pequeñas" (1,0-2,5  $\mu\text{m}$ ). Esta clasificación es importante para determinar las posibles especies involucradas durante el examen citológico de frotis de sangre (Yabsley y Shock, 2013).

La identificación basada en el origen del huésped se basó en la suposición de que estos parásitos son específicos del huésped, que ahora sabemos que no es el caso de muchas especies. La caracterización molecular de múltiples genes indica que los piroplasmas deben dividirse en al menos cinco o seis grupos: uno que incluye Babesias pequeñas de roedores salvajes, felinos, canidos (grupo Microti); otro incluye parásitos de cérvidos, perros y personas (grupo Duncani); un tercero incluye especies caninas, bovinas y cervicales (babesidos); otro más incluye especies bovinas, equinas y ovinas (unguilibabesidas); Y un grupo final incluye *Theileria* y *Cytauxzoon* spp. Por otra parte, debido a la falta de datos genéticos y del ciclo de vida para varias especies de Babesia, la validez de algunas de estas especies, necesitan mayor confirmación (Dantas-Torres *et al.*, 2017).

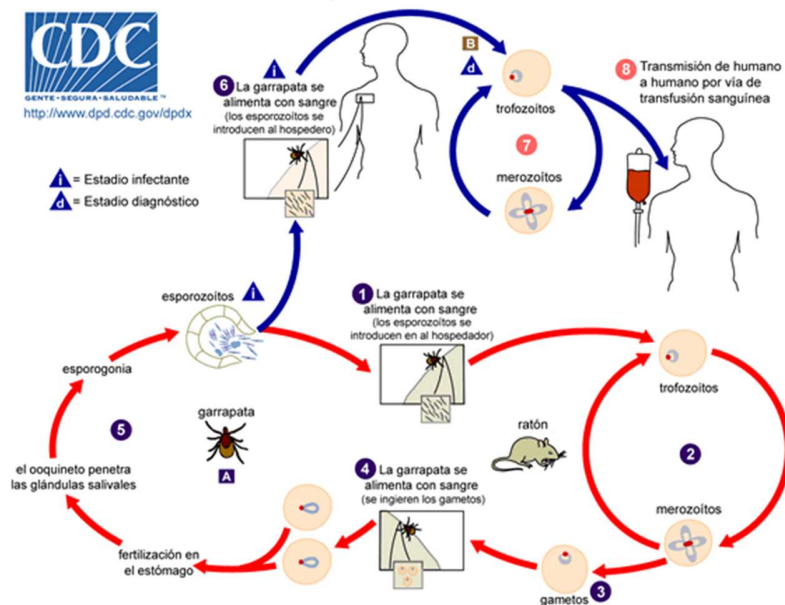
**Tabla 5.** Principales especies de *Babesia* de importancia médico-veterinaria. Resumida de Dantas-Torres *et al.* (2017) con énfasis en especies de importancia humana y/o en América.

Especies	Hospedero(s) principal(es)	Géneros vectores	Distribución geográfica
<i>B. bigemina</i>	Ganado, búfalo	<i>Rhipicephalus</i>	África, América, Asia, Australia, Europa
<i>B. bovis</i>	Ganado, búfalo, humano?	<i>Rhipicephalus</i>	África, América, Asia, Australia, Europa
<i>B. caballi</i>	Caballo, asno, mula	<i>Dermacentor</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Rhipicephalus</i>	África, América, Asia, Europa
<i>B. conradae</i>	Perro	Desconocido	América (E.U)
<i>B. divergens</i>	Ganado, humano	<i>Ixodes</i>	Europa
<i>B. duncani</i>	Humano	Desconocido	Estados Unidos
<i>B. gibsoni</i>	Perro	<i>Haemaphysalis</i>	África, América, Asia, Europa
<i>B. microti</i>	Roedores, humano	<i>Ixodes</i>	África, América, Asia, Australia, Europa
<i>B. venatorum</i>	Corzo, humano	<i>Ixodes</i>	Europa
<i>B. vogeli</i>	Perro, gato	<i>Rhipicephalus</i>	África, América, Asia, Australia, Europa

### 2.9.2 Patogénesis.

El ciclo de vida de *Babesia* spp. Es compleja e implica al menos tres etapas de reproducción: gamogonia (formación y fusión de gametos dentro de la garrapata), esporogonia (reproducción asexual en las glándulas salivales de la garrapata) y merogonia (reproducción asexual en el huésped vertebrado)(Dantas-Torres *et al.*, 2017).

El ciclo de vida *Babesia* (Fig.11) involucra a dos huéspedes, que incluyen al ratón blanco, *Peromyscus leucopus*, y garrapatas del género *Ixodes*. (1) Durante su alimentación, la garrapata infectada con *Babesia* introduce los esporozoitos en el huésped. (2) Los esporozoitos ingresan a los eritrocitos y se reproducen asexualmente. (3) En la sangre, algunos parásitos se diferencian en gametos masculinos y femeninos. (4) El huésped definitivo es la garrapata. (5) Una vez ingeridos, los gametos se unen y sufren un ciclo esporogónico que da como resultado esporozoitos. (A) La transmisión vertical o hereditaria se ha documentado para las especies "grandes" de *Babesia*. (6) Los seres humanos entran en el ciclo cuando son mordidos por garrapatas infectadas con *Babesia* que introduce los esporozoitos en el humano. (7) Los esporozoitos entran en los eritrocitos y experimentan una replicación asexual. (B) La multiplicación de los parásitos en sangre es responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. (8) Sin embargo, la transmisión de humano a humano se reconoce bien a través de transfusiones de sangre contaminada, Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2018).

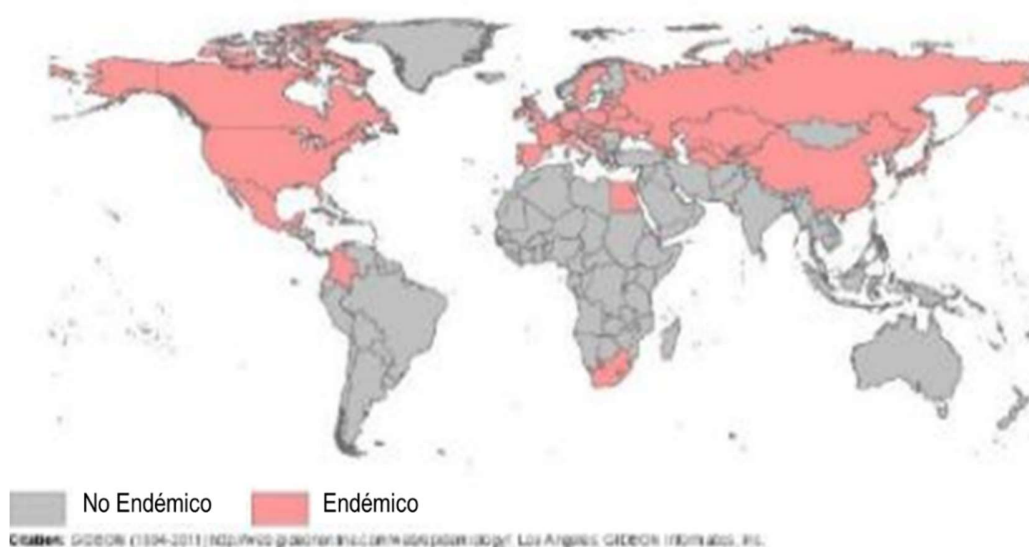


**Figura 10-** Ciclo de vida de *Babesia* spp. (CDC, 2018)

### 2.9.3 Distribución

Babesiosis, es una de las infecciones más comunes de animales de vida libre en todo el mundo (Fig.12) y está cobrando cada vez mayor interés como una zoonosis emergente en los seres humanos. La mayoría de los casos de infecciones babésicas en humanos se han adquirido en regiones templadas de los Estados Unidos y Europa. Algunos casos de babesiosis han sido descritos en otras partes del mundo, incluyendo China, Taiwán, Egipto, Sudáfrica y México (Homer *et al.*, 2000).

Ha habido varios casos de babesiosis adquirida por transfusión en los Estados Unidos y ninguno se ha informado hasta ahora en Europa o en otros lugares. La mayoría de éstos han implicado la transmisión de *B. microti* de un donante asintomático. El riesgo y la prevalencia de la infección por *Babesia* en diferentes poblaciones de animales están relacionados con varios factores, incluyendo la presencia y abundancia de vectores de garrapatas. La incidencia de babesiosis en las zonas endémicas es alta durante la temporada de garrapatas, por ejemplo, los casos de babesiosis humana ocurren generalmente entre mayo y octubre en Europa, mientras que en los Estados Unidos, la transmisión ocurre normalmente entre mayo y septiembre (Dantas-Torres *et al.*, 2017).



**Figura 11** Distribución de Babesiosis, se muestra zonas endémicas y no endémicas. Tomada de: <https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick>



## 2.10 Tularemia

Durante la investigación sobre la peste en áreas endémicas, la tularemia fue descubierta e inicialmente identificada como una especie de peste llamada "pseudo-plaga". En 1911, el agente etiológico, inicialmente llamado *Bacterium Tularensis*, fue aislado de las ardillas en la ciudad de Tulare, California (EE.UU.). El síndrome se caracterizó en 1912, con los primeros casos humanos observados en 1914. Los estudios de esta enfermedad zoonótica progresaron en todos los aspectos a partir de entonces, con gran parte del trabajo realizado por el investigador Edward Francis. Debido a su compromiso con la investigación sobre esta zoonosis, el nombre del bacilo se cambió a *Francisella tularensis* en su honor (Leal-Balbino *et al.*, 2017).

Hachiro Ohara estaba estudiando la enfermedad de liebre salvaje (Yato-byo) en Japón y reconoció que la enfermedad es similar a la tularemia. Su observación fue confirmada por Francis, que aisló *B. tularensis* de especímenes que recibió de Ohara. Por lo tanto, los nombres de la fiebre de la mosca, la fiebre del conejo, la peste del Valle de Pahvant, la fiebre del lemming, Yato-byo, la enfermedad de Ohara, la enfermedad del trampero de agua-rata, el envenenamiento de la carne de liebre y probablemente también otros nombres históricos son sinónimos de la tularemia (Kubelkova y Macela, 2015).

Existen seis síndromes clínicos principales de tularemia (tabla 7), cada uno con diferentes presentaciones clínicas: tularemia ulceroglandular (42% -75% de todos los casos de tularemia), tularemia glandular (15-44% de todos los casos de tularemia), tularemia orofaríngea, tularemia oculoglandular, tularemia tifoidal, y la tularemia neumónica (Harik, 2013).

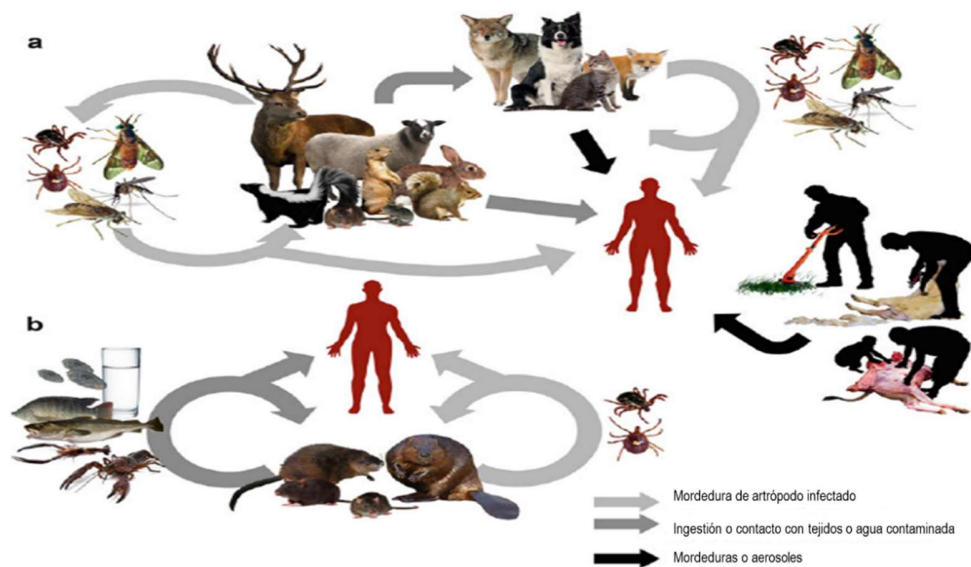
**Tabla 6.** Síndromes Clínicos de Tularemia. Tomada de Harik (2013)

Síndromes de Tularemia	Características	Portal de entrada
Ulceroglandular	Pápula cutánea seguida de úlcera, linfadenopatía sensible, fiebre.	piel
Glandular	Linfadenopatía sensible, fiebre	Desconocido (probablemente piel)
Orofaringeo	Faringitis severa, linfadenitis cervical, fiebre	Mucosa orofaríngea
Oculoglandular	Conjuntivitis, síndrome oculoglandular de Parinaud	Conjuntiva
Tifoideo	Fiebre de causa desconocida, sepsis, mialgia, dolor de cabeza	Mucosa orofaríngea o tracto respiratorio
Neumónico	Neumonía, fiebre.	Tracto respiratorio

### 2.10.1 Agente etiológico

*Francisella tularensis*, un cocobacilo gram negativo, pequeño, fastidioso, y aerobio. Hay cuatro subespecies distintas de *F. tularensis*; Sin embargo, la enfermedad es causada principalmente por la subespecie tularensis de *F. tularensis* (tipo A) y la subespecie holarctica de *F. tularensis* (tipo B). Siendo el tipo A el más virulento. *F. tularensis* es altamente contagiosa; Sólo se necesita un pequeño inóculo para producir la enfermedad (Harik, 2013).

La infección *F. tularensis* por se ha demostrado en más de 250 vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios) e invertebrados (artrópodos) alrededor del mundo. Actualmente se describen dos ciclos biológicos: terrestre y acuático (Fig.12). La tularemia tipo A (*F. tularensis* subsp. Tularensis) está más asociada al ciclo de la enfermedad terrestre, siendo los conejos y liebres silvestres los que actúan como huéspedes principales y los vectores de artrópodos (garrapatas y moscas de caballo) como agentes propagadores del patógeno. La tularemia tipo B (*F. tularensis* holarctica) se asocia con mayor frecuencia a ciclos acuáticos, pero también puede ser transmitida por garrapatas. En este ciclo, las ratas almizcleras, los castores y los campañoles propagan las bacterias en su hábitat acuático, y los humanos se infectan directamente ingiriendo agua contaminada o animales infectados (Leal-Balbino *et al.*, 2017).

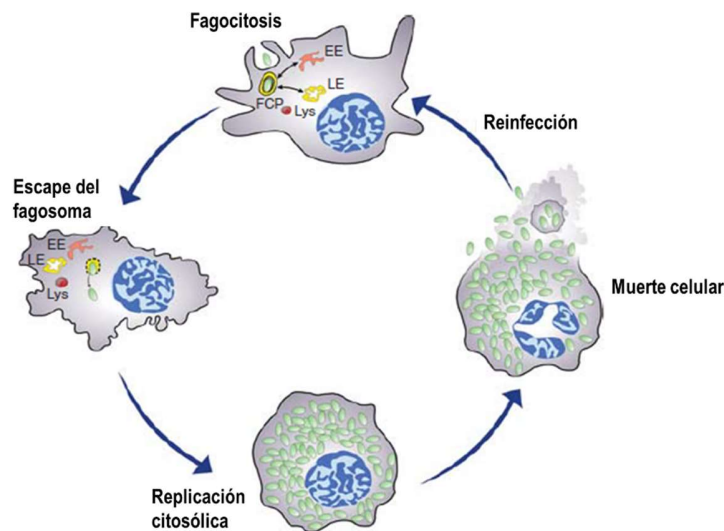


**Figura 12** Ciclos Zoonoticos de *Francisella tularensis*. Tomada de Leal-Balbino *et al.* (2017).

### 2.10.2 Patogénesis

Aunque *Francisella* muestra una fase extracelular durante bacteriemia en ratones, se cree que la supervivencia y la replicación dentro de las células huésped es un aspecto clave de su ciclo de vida. Esto se ejemplifica por la capacidad de varias cepas de *F. tularensis* subsp. *Tularensis* y *holarctica* y de *F. novicida* para entrar, sobrevivir y proliferar dentro de una variedad de tipos de células huésped, incluyendo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos polimorfonucleares, hepatocitos, endoteliales y células epiteliales alveolares de tipo II. Debido a que la proliferación intracelular es esencial para la virulencia de *Francisella*, muchas investigaciones se han centrado en comprender y caracterizar etapas específicas en el ciclo intracelular de esta bacteria (Celli y Zahrt, 2013)

La Fig. 13 muestra el modelo del ciclo intracelular de *Francisella* que representa etapas que son comunes a los fagocitos murinos y humanos. Tras la fagocitosis, las bacterias residen en un fagosoma temprano (FCP) que interactúa con los compartimentos endocíticos temprano (EE) y tardío (LE), pero no con lisosomas (Lys). Las bacterias interrumpen rápidamente la membrana FCP y alcanzan el citosol donde experimentan una replicación extensa, un proceso seguido por la muerte celular, la liberación bacteriana y la infección subsiguiente (Celli y Zahrt, 2013).

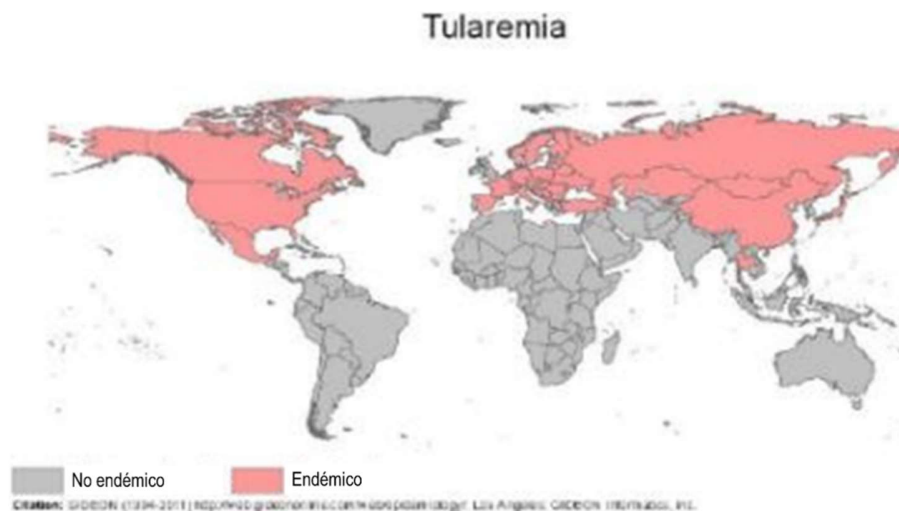


**Figura 13.** Ciclo celular de *Francisella tularensis*. Tomada de Celli y Zahrt (2013)

### 2.10.3 Distribución

*Francisella tularensis* está ampliamente distribuida a lo largo del hemisferio norte (Fig.) y a pesar de una disminución global en los casos humanos reportados, la tularemia ha reemergido recientemente en varios países incluyendo Suecia, Kosovo, China, Bulgaria y partes de la antigua Unión Soviética (U.S). Históricamente, los brotes en la U.S se vincularon a los pequeños mamíferos y artrópodos (garrapatas), posiblemente relacionados con el aumento de la abundancia de animales hospederos o del vector. Los brotes de tularemia más recientes en Bulgaria y Georgia, han reforzado la necesidad de seguir vigilando y de tomar medidas preventivas en las zonas endémicas (Hightower *et al.*, 2014).

En EE. UU., del 2001 al 2010 se notificaron anualmente a la CDC de 90 a 154 casos de tularemia. La tularemia fue reportada en todos los estados, excepto Hawái. Arkansas, Oklahoma y Missouri representan aproximadamente 50 % De los casos de tularemia reportados en los Estados Unidos cada año (Harik, 2013).



**Figura 14.** Tomada de: <https://mygermanshepherd.org/periodical/how-to-get-rid-of-tick>

### 2.11 Reservorios

La distribución las garrapatas se ve influenciada principalmente por las variaciones climáticas y geográficas, así como la migración de aves a las que infestan e incluso la dinámica poblacional normal de los demás hospederos, lo que hace de la garrapata una especie con un

potencial de distribución muy alto, además facilita su introducción en sitios donde no se encontraba naturalmente, lo que aumenta el riesgo en el humano de adquirir infecciones transmitidas por garrapatas (TBI) (Shaw *et al.*, 2003). y algunos patógenos como *B. burgdorferi* y *Anaplasma phagocytophilum* pueden infectar a diversos huéspedes (tanto silvestres como domésticos), sin embargo, todos estos agentes zoonóticos están asociados con reservorios de vida silvestre. (Baneth, 2014)

Las consecuencias de los cambios en la comunidad de animales que actúan como hospedadores de enfermedades infecciosas, incluyendo las enfermedades transmitidas por vector (VBDs), han recibido especial atención en los últimos años ya que la alteración en la abundancia de este puede causar cambios en la prevalencia de infección del vector y, con ello, el riesgo de exposición para un huésped dado, como el humano, por lo que los vínculos entre la biodiversidad y el riesgo de enfermedad individual son inevitables. (Dobson y Auld, 2016).

Las especies hospederas pueden diferir mucho con respecto a la susceptibilidad a la transmisión, el mantenimiento y la proliferación de patógenos, además las interacciones de estas especies con patógenos pueden verse fuertemente afectadas por la presencia de especies con las que interactúan, incluidos los depredadores, competidores y otros parásitos, dentro de estas comunidades (Ostfeld y Keesing, 2012).

Una alimentación exitosa es importante en la dinámica poblacional de los ectoparásitos y en la transmisión de patógenos, dentro de los factores que afectan la alimentación con sangre incluyen la densidad de ectoparásitos, las defensas del huésped y las edades del huésped y el ectoparásito. Las cargas de ectoparásito en los animales salvajes varían por muchas características del huésped, como sexo, edad, tamaño corporal y condición física lo que puede reflejar variaciones en la exposición a las garrapatas que buscan al huésped. (Jones *et al.*, 2015)

Alternativamente el huésped puede mostrar rasgos de comportamiento diferente después del contacto con parásitos, por ejemplo, el acicalamiento es la primera línea de defensa de los mamíferos salvajes contra la infestación de ectoparásitos y mucha de la evidencia apunta al papel central de las garrapatas en la evolución de este comportamiento. Los animales con este comportamiento pobre o mal desarrollado son vulnerables a una infestación excesiva de garrapatas dando a los individuos con este comportamiento mejor desarrollado una ventaja selectiva (Mooring *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014).

### **2.11.1 Venado**

El venado cola blanca mantiene un doble papel en la supervivencia y la proliferación de las garrapatas, al servir como una fuente de alimento preferido y como un vehículo para el transporte y la localización de su hábitat preferido (Paddock y Yabsley 2007).

El intenso manejo de la vida salvaje para la caza, incrementa los riesgos de patógenos zoonóticos; el aprovechamiento del venado cola blanca se ha incrementado a través de vallas, alimentación, bebida y traslados, para aumentar los ingresos de la caza en el noreste de México (Medrano *et al.*, 2012). Esta zona, que abarca los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, constituye la mayor área de granjas para caza del venado cola blanca y por lo general ocupan las mismas aéreas con el ganado compartiendo pastura (Cantú-Martínez *et al.*, 2008). Por lo que también pueden compartir enfermedades infecciosas; los agentes infecciosos pueden ser transmitidos del venado al ganado y del ganado al venado y ocasionalmente al humano (Martínez *et al.*, 1999).

### **2.11.2 Borrego cimarrón**

El borrego cimarrón es uno de los grandes mamíferos silvestres de México y una de las especies más importantes por su alto valor ecológico y económico. Sin embargo, la fragmentación del hábitat, la introducción de especies domésticas y recientemente, los esfuerzos por construir una cerca fronteriza, han creado preocupación sobre el impacto que pueda tener a esta especie ya que se encuentra dentro de la lista de especies en peligro (Buchalski *et al.*, 2015).

Poblaciones de borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) seropositivos para *Anaplasma spp* fueron identificados en California, lo que sugiere un papel de esta especie en la epidemiología de *Anaplasma spp* (de la Fuente *et al.*, 2006) se ha observado que causa enfermedad grave en el borrego cimarrón y puede predisponer al hospedero a otros patógenos, ya que la enfermedad aguda se ha asociado a coinfecciones, además de clima cálido, vacunación, desparasitación, grado de infestación de garrapatas, transporte y movimiento de los animales por largas distancias (Renneker *et al.*, 2013; Altay *et al.*, 2014).

### 2.13 Coinfecciones

La fauna y los seres humanos son frecuentemente infectados por múltiples patógenos o varios genotipos de un solo patógeno. Infecciones mixtas en las garrapatas también pueden influir potencialmente dinámica de transmisión, ya sea por interacciones entre los patógenos dentro de las garrapatas o por los efectos en el comportamiento y supervivencia de las garrapatas (Ginsberg, 2008). Por ejemplo, Ross y Levin en el 2004 encontraron que algunas cepas de *Anaplasma phagocytophilum*, el agente etiológico de la anaplasmosis granulocítica en humanos, afectan la muda de garrapatas *Ixodes scapularis*.

Los patógenos coinfectantes pueden interactuar entre sí y con los simbioses del huésped por la utilización de los recursos o mediante la modulación del sistema inmune del huésped. Las interacciones positivas (facilitación) favorecen la aparición de un patógeno invasor o aumentan la prevalencia de un patógeno establecido. (Diuk-Wasser *et al.*, 2016). En 2003 Alekseev y Semenov realizaron un estudio para detectar la infección por *B. microti* en Rusia, donde encontraron que de 738 garrapatas *I. persulcatus*, las 7 garrapatas infectadas por dicho patógeno estaban coinfectadas con otros, incluido *Borrelia spp.* y virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV).

Las interacciones negativas (competencia) pueden prevenir el establecimiento de un patógeno invasor o conducir una extinción patogénica establecida (Diuk-Wasser *et al.*, 2016). Alekseev *et al.* en 1996 presentaron evidencia de que la infección por *Borrelia* suprimió la replicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas en *I. persulcatus*. Además en el 2002 De la Fuente *et al.*, inocularon células de *I. scapularis* con diferentes cepas de *Anaplasma marginale*, y encontraron que solo una de estas persistió y que la infección por *A. ovis* excluyó a *A. marginale* en dichas células.

Quizá el ejemplo más estudiado es la infección y colonización por *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* que ocurre primero en las células intestinales de las garrapatas y luego en otros tejidos, incluidas las glándulas salivales desde donde se produce la transmisión durante la alimentación, y se ha demostrado que la coinfección con estos dos patógenos puede aumentar significativamente el potencial de propagación de la enfermedad de Lyme. Esta coinfección también provoca diferentes respuestas del sistema inmunitario dentro de ratones hospederos: la respuesta de anticuerpos a *A. phagocytophilum* disminuyó durante la coinfección, pero los anticuerpos producidos en respuesta a *B. burgdorferi* aumentaron. Además, neutrófilos

infectados con *A. phagocytophilum* mejoran la trans migración de *B. burgdorferi* a través de la barrera hematoencefálica humana. Todo esto sugiere que la coinfección tiene un gran impacto en la condición física, la transmisión y la patología de estos dos microorganismos (Cabezas-Cruz *et al.*, 2018).

En la tabla 8 se muestran otros ejemplos como las coinfecciones alteran significativamente la biología de los microorganismos que coocurren en las garrapatas.

**Tabla 7.** Coinfecciones y como estas alteran la biología de los microorganismos. Tomada de Cabezas-Cruz *et al.* (2018).

Coinfección	Efecto
<i>Anaplasma/Borrelia</i>	Respuesta disminuida de anticuerpos contra <i>A. phagocytophilum</i>
<i>Borrelia/Anaplasma</i>	Incrementa la trans migración de <i>Borrelia burgdorferi</i> a través de la barrera hematoencefálica humana
<i>Borrelia/ Babesia microti</i>	Incrementa la transmisión del ratón a la garrapata

Las coinfecciones pueden transmitirse por garrapatas vector simultáneamente durante la misma comida de sangre o pueden ser causadas por una infección que precede a la otra. La introducción de una nueva infección en el huésped puede facilitar la diseminación de una infección latente ya presente, o la presencia de una infección previa puede permitir el establecimiento de una nueva infección que de otro modo sería eliminada por mecanismos de defensa inmunológica. Alternativamente, los anfitriones pueden estar coinfectados por picaduras de garrapatas separadas y en diferentes momentos, pero en huéspedes en las que las mordedura de garrapatas son relativamente bajas (por ejemplo, seres humanos) las coinfecciones pueden resultar una sola garrapata (Baneth, 2014; Ginsberg, 2008) La coinfección rara vez puede asociarse con las garrapatas reales que la transmitieron y es difícil saber en qué animal hospedador se alimentó la garrapata del patógeno en particular (Baneth, 2014).

La coinfección y la co-transmisión de patógenos por las garrapatas pueden tener importantes implicaciones para la salud pública. Se ha informado de la babesiosis y la enfermedad de Lyme concurrentes puede tener consecuencias importantes en términos de tratamiento y el diagnóstico. Coinfecciones con diferentes patógenos son comúnmente reportados en humanos y animales. Por ejemplo, en los EE.UU. se demostró que el 11% de los



pacientes con enfermedad de Lyme en el sur de Nueva Inglaterra presentaban babesiosis concurrente y el 13% de los pacientes con enfermedad de Lyme en Wisconsin también contrajeron anaplasmosis granulocítica humana (Moutailler *et al.*, 2016). Krause *et al* en el 2002 mostraron que 310 pacientes norteamericanos sospechosos de tener una TBD y examinados para Lyme, HGA y babesiosis, 117 pacientes sufrieron infecciones únicas, 75 coinfecciones, y 4 individuos fueron positivos para la enfermedad de Lyme, HGA y Babesiosis.

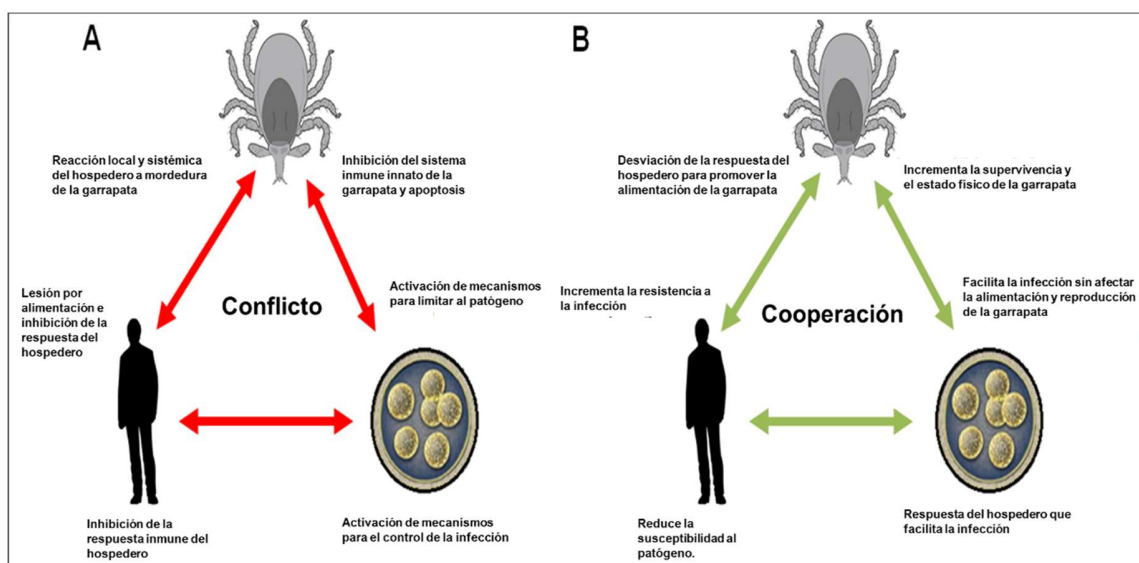
La mayoría de las coinfecciones implican dos de los tres principales patógenos conocidos: *B. burgdorferi sensu lato*, *A. phagocytophilum*, y *Babesia spp.* Tales coinfecciones ocurren hasta en un 28% de las garrapatas *I. scapularis* en áreas de E.U.A endémicas de la enfermedad Lyme (Swanson *et al.*, 2006).

Estudios de secuenciación de nueva generación (NGS) han demostrado que los patógenos están íntimamente asociados a la vasta comunidad de microorganismos (incluidos otros patógenos) y al dilucidar su influencia en la biología de garrapatas, la persistencia, la transmisión y la virulencia de patógenos justifican la necesidad de pasar del estudio de patógenos aislados a un enfoque más integrado, donde se reconoce que el patógeno está aunado a su entorno abiótico y biótico (es decir, incluye otros patógenos, comensales y simbioses). Finalmente, han revelado que la "infección de patógenos únicos o múltiples" son escenarios idealizados, donde la "transmisión de patógenos" parece ser una concepción limitada de un fenómeno más amplio donde patógenos, simbioses y comensales migran a través de sistemas biológicos (Cabezas-Cruz *et al.*, 2018).

## **2.14 Interacciones vector-huésped- patógeno**

La tasa de éxito de los patógenos transmitidos por garrapatas se debe principalmente de su adaptación a la alimentación de sangre relativamente prolongada. Las interacciones garrapata-huésped-patógeno han evolucionado a través de procesos dinámicos que involucran los rasgos genéticos del huésped, patógenos y garrapatas que median su desarrollo y supervivencia. La coevolución de las estas interacciones facilita la infección de patógenos al tiempo que protege a las garrapatas y huéspedes de los impactos producidos por dicha infección, lo que garantiza su supervivencia y transmisión. Estas interacciones entre organismos pueden producir conflicto y cooperación (Fig. 15) (De la Fuente *et al.*, 2015, 2016).

Las garrapatas producen una lesión al alimentarse, ante esto el hospedero reacciona con la formación de un tapón hemostático, activación de la cascada de coagulación, vasoconstricción, y respuestas inflamatorias que llevan a la cicatrización de la herida y remodelación del tejido, lo anterior interrumpiría la alimentación de las garrapatas, sin embargo logran completarla debido a la presencia de una gran cantidad de moléculas con actividad anticoagulante, antiplaquetaria, vasodilatadoras, antiinflamatoria e inmunomoduladoras en su saliva (Kazimírová y Štibrániová, 2013).

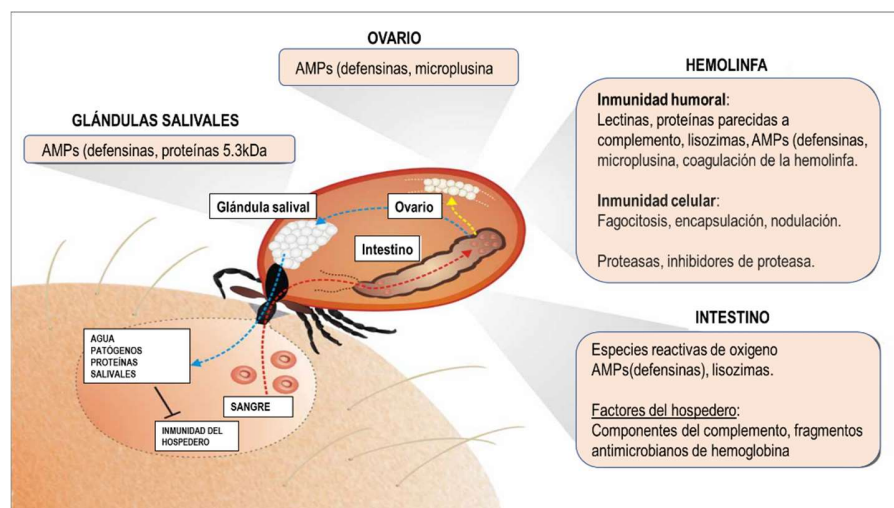


**Figura 15** Ejemplos de conflicto (A) y cooperación (B) en las interacciones garrapata-patógeno- huésped. Tomada de De la Fuente *et al.* (2016)

Estas moléculas se han desarrollado durante la coevolución entre el parásito y huésped, además facilitan la adquisición y transmisión de patógenos, lo cual ha sido descrito como transmisión asistida por saliva (SAT). Los mecanismos por los cuales estas moléculas SAT median la transmisión de patógenos son en gran parte desconocidos, y hasta la fecha, solo se han identificado unas pocas asociadas a la transmisión de patógenos específicos y sus funciones no se han aclarado. (Kazimírová y Štibrániová, 2013). La sangre ingerida se acumula en el intestino, la hemoglobina y otras proteínas son absorbidas por y digeridas intracelularmente en lisosomas (Sojka *et al.*, 2013). Aminoácidos y otros compuestos son liberados y transportados a tejidos periféricos y ovarios, donde su función principal es el desarrollo del huevo, mientras los

patógenos deben superar varias barreras tisulares, como lo son: intestino, hemocele y glándulas salivales u ovarios (en caso de transmisión transovárica) además deben sobrevivir al período entre la muda y la alimentación posterior de la siguiente etapa de desarrollo (Hajdušek *et al.*, 2013).

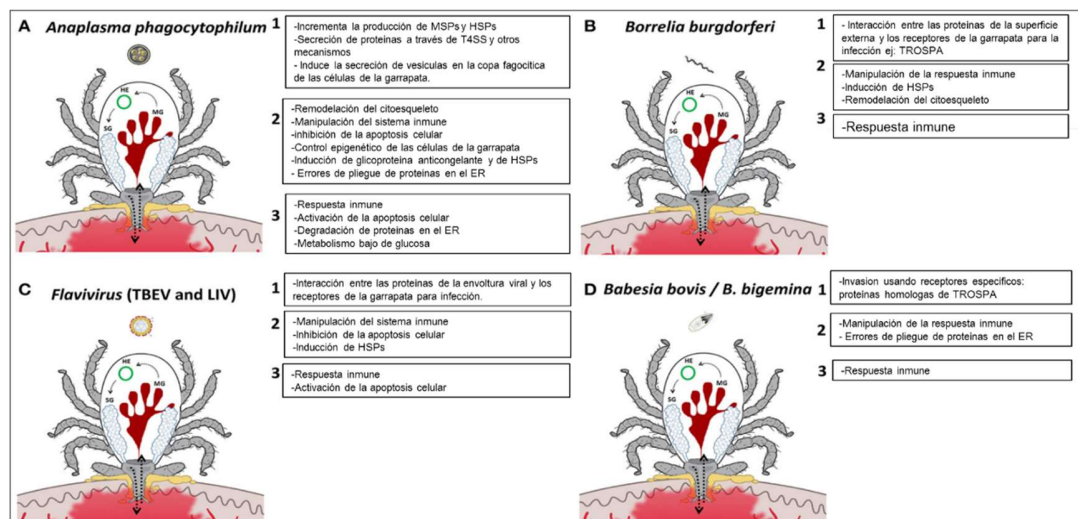
En su recorrido desde el intestino medio hasta los tejidos periféricos, los patógenos se enfrentan a mecanismos de defensa humoral que involucran cascadas de señalización innata como lo son las vías Toll, de Inmunodeficiencia (IMD) y la Janus quinasa / transductor de señal y activador de la transcripción (JAK/STAT) que son activadas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Chávez *et al.*, 2017). En consecuencia, desencadenan una impresionante variedad de respuestas humores y celulares, incluyendo péptidos antimicrobianos (AMPs), por ejemplo, defensinas, lisozimas, microplusinas, etc., que matan, atrapan o inhiben directamente a los invasores. Igualmente, importantes son los procesos celulares, principalmente la fagocitosis por los hemocitos de la hemolinfa, que capturan, ingieren o encapsulan microbios invasores, regulados por un sistema primordial de proteínas que contienen tioéster, lectinas relacionadas con fibrinógeno y factores de convertasa. Las garrapatas también expresan especies reactivas de oxígeno (ROS), así como glutatión-S-transferasa, superóxido dismutasa, proteínas de choque térmico (HSP) e incluso inhibidores de proteasa, logrando así mantener patógenos y comensales sin afectar su estado físico ni desarrollo (Fig. 16) (Hajdušek *et al.*, 2013; Sonenshine y Macaluso, 2017).



**Figura 16.** Mecanismos inmunes y moleculares que constituyen barreras potenciales para la transmisión de patógenos. Tomada de Hajdušek *et al.* (2013)

Alteraciones en la composición del microbioma también pueden dar lugar a diferencias en los niveles de activación de las moléculas de respuesta inmune y algunos patógenos transmitidos por garrapatas logran inhibir todos estos mecanismos de defensa a través de la remodelación del citoesqueleto, inhibición de la apoptosis celular, manipulación de la respuesta inmune y control de la epigenética de la célula huésped (la figura 17 esquematiza algunos ejemplos de estos mecanismos) (De la Fuente *et al.*, 2016) y podrían haber evolucionado para explotar la fricción normal que acompaña al diálogo garrapata-microbiota (Fig. 18).

Así que definir los perfiles microbianos intestinales que favorecen o perjudican la colonización de patógenos es de importancia, para explotar completamente el microbioma y controlar tanto a las garrapatas como los patógenos. (Narasimhan y Fikrig, 2015).

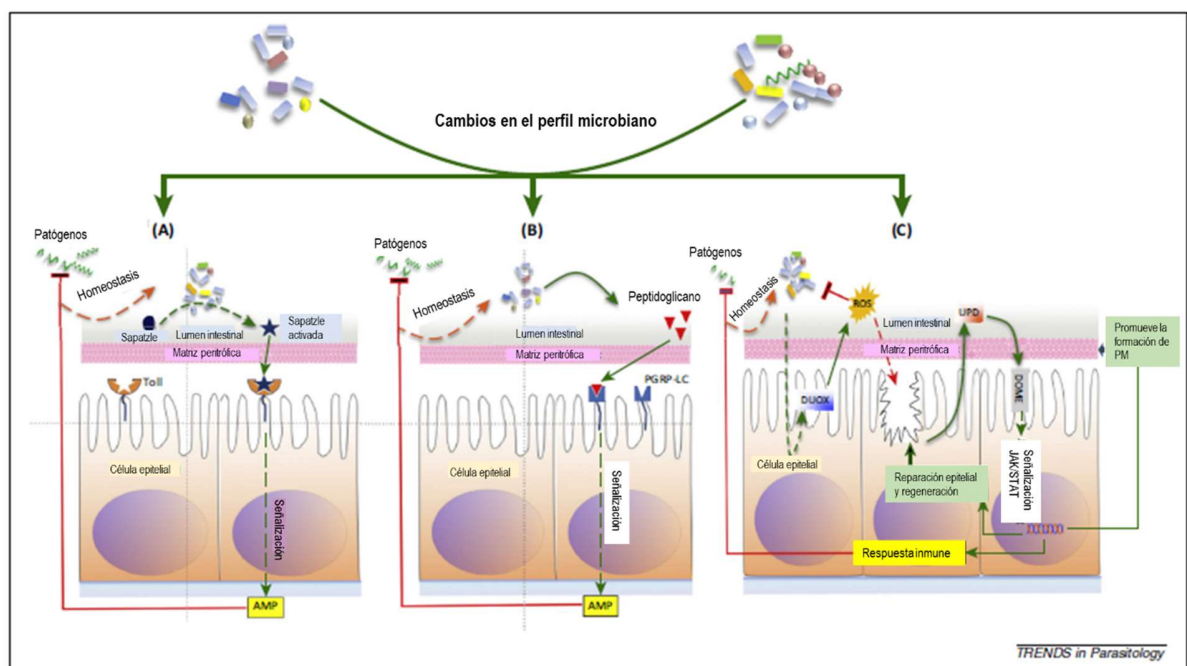


**Figura 17.** Interacciones moleculares Garrapata- Patógeno, Los patógenos activan mecanismos (1) y manipulan las respuestas de protección contra garrapatas y otros procesos biológicos para facilitar la infección (2), mientras que las garrapatas responden para limitar la infección y preservar la aptitud alimenticia y la competencia vectorial para la supervivencia de garrapatas y patógenos (3). MG, intestino medio; HE, hemocito; SG, glándula salival; MSPs, proteínas de superficie mayores; HSPs, proteínas de choque térmico; ER, retículo endoplásmico. Tomada de De la Fuente *et al.* (2017)

## 2.15 Diversidad del microbioma de las garrapatas

Las asociaciones de garrapatas con bacterias no patógenas fueron reconocidas definitivamente por Cowdry a principios del siglo XX, usando microscopía óptica, observó que una amplia variedad de garrapatas (al menos 16 especies de garrapatas) albergaban bacterias

Gram-negativas de tipo *Rickettsia* en diversos tejidos incluyendo huevos, ovarios, túbulos de Malpighi y células epiteliales intestinales de larvas no infectadas, con ligeras diferencias en la morfología de las bacterias entre las especies de garrapatas. También notó diferentes especies de bacterias dentro de la misma célula que no se asociaban entre sí, pero tendían a formar grupos distintos aglomerados, y su presencia no parecía tener ningún efecto perjudicial sobre las células. Estos primeros hallazgos se han corroborado desde entonces, y varios endosimbiontes bacterianos de garrapatas sus interacciones se han identificado como comensales, mutualista, o parásitos (Narasimhan y Fikrig, 2015).



**Figura 18** Cambios en el microbioma de la garrapata y la consecuente respuesta inmune en el intestino de la garrapata. Tomada de Narasimhan y Fikrig (2015)

Las interacciones que se producen entre las comunidades microbianas dentro de la garrapata, pueden ser competitivas, exclusivas, facilitadoras o ausentes, pudiendo afectar la colonización, transmisión y virulencia de patógenos ya sea directamente a través de la competencia de nutrientes o la inmunidad inducida / reducida, o indirectamente al afectar la viabilidad, reproducción o estado físico de la garrapata, pero los estudios sobre las relaciones entre garrapatas, el huésped vertebrado y el patógeno, han dado por lo general poca consideración a estas interacciones y a toda la comunidad microbiana entera, incluyendo

endosimbiontes y otros microbios de función desconocida, y el papel de los endosimbiontes de garrapatas en la transmisión de patógenos solo se ha estudiado en algunas pocas especies bacterianas y de garrapatas. Además, muchos de estos endosimbiontes son intracelulares obligados y difíciles de cultivar, lo que explica las brechas en el conocimiento actual (Bonnet *et al.*, 2017; Clay *et al.*, 2010; De la Fuente *et al.*, 2017).

En los artrópodos, generalmente se reconocen dos categorías de endosimbiontes generalizados, aunque los intermedios y las formas de transición también son frecuentes:

- La primera categoría consiste en simbioses mutualistas obligatorios (primarios) requeridos para apoyar el desarrollo normal del huésped, ayudándolo en varias funciones esenciales.

- La segunda categoría consiste en simbioses facultativos (secundarios) que no se requieren para la supervivencia del huésped, pero pueden conferir protección contra enemigos naturales o calor, o manipulan la reproducción del huésped.

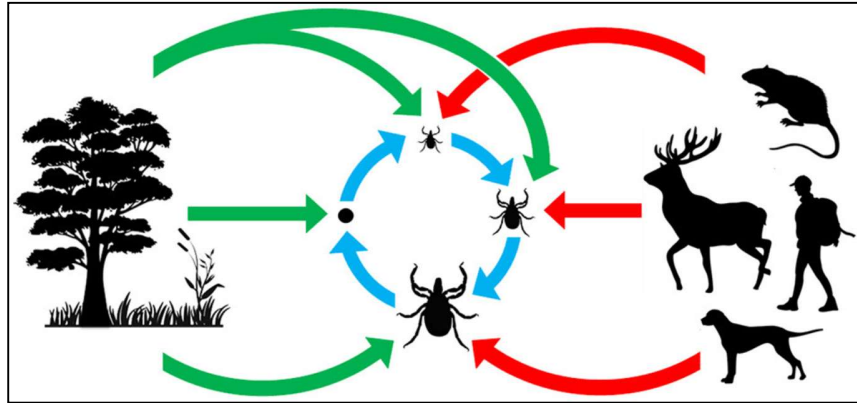
La composición de estas comunidades microbianas se debe a factores, como: ambiente (laboratorio o silvestre), especie y estadio de la garrapata, estado de alimentación, temporada de colecta, región geográfica, y la presencia de patógenos (Bonnet *et al.*, 2017).

Además de la vía transovarial, es concebible que el microbiota materno pueda servir como el primer inóculo en los huevos y las larvas en desarrollo. La copulación y el microbiota en la piel del huésped también pueden contribuir esta diversidad, así como macroparásitos de las garrapatas, por ejemplo, se ha sugerido que *Wolbachia pipientis* puede no ser un endosimbionte natural de las garrapatas, sino que se ha introducido en el microbioma de las garrapatas por una avispa parásita. Otras variables que también pueden considerarse son: el grado de alimentación, moléculas inmunes del huésped presentes en la ingesta de sangre, y cambios intestinales en respuesta a la alimentación (Greay *et al.*, 2018). No obstante, los diversos microbiotas ambientales a las que pueden acceder a la garrapata, solo unas pocas se convierten en miembros de *bona fide* de su microbioma (Narasimhan y Fikrig, 2015).

La Figura 19 esquematiza el origen y adquisición del microbioma de las garrapatas, donde las flechas rojas representan el microbioma obtenido de los huéspedes, las azules el microbioma obtenido vía materna o trasestadial y las verdes el adquirido por factores ambientales.

En los últimos años, el rápido desarrollo de los métodos NGS ha revolucionado la investigación de epidemiológica y el diagnóstico de enfermedades infecciosas, facilitando la

detección completa de patógenos dentro de sus huéspedes, así como el descubrimiento de nuevos patógenos o inesperados.



**Figura 19.** Origen y adquisición del microbioma bacteriano de las garrapatas.  
Tomada de Bonnet *et al.* (2017)

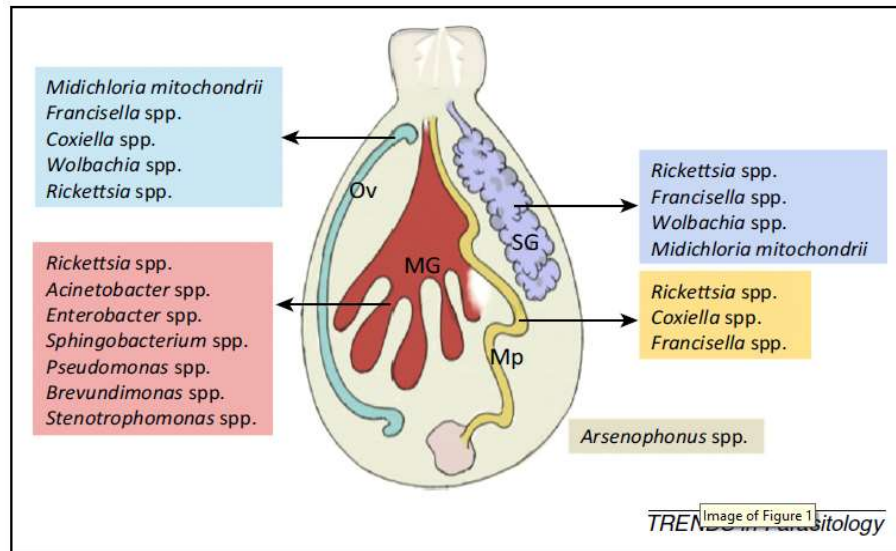
Recientemente se ha utilizado la NGS con éxito para identificar las comunidades bacterianas asociadas a *I. ricinus* con base en amplificación y secuenciación de regiones hipervariables de los genes que codifican rRNA 16S (perfil metagenómico), revelando una comunidad microbiana muy diversa (108 géneros que representan todos los phyla bacterianos) (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015).

En todas las genospecies de garrapatas duras predominan las bacterias del filo Proteobacteria, seguidas de *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Los miembros bacterianos de la phylum *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*. Se han observado bacterias tanto aeróbicas como anaeróbicas, predominado las bacterias Gramnegativas. A nivel de género, algunos miembros son representativos cada especie de la garrapata sin importar su localizaciones geográficas, por ejemplo: *Rickettsia* y *Coxiella* en *Amblyomma americanum* y *Rhipicephalus* spp.; *Rickettsia* en casi todos los *Ixodes* spp.; Y *Wolbachia* en *Ixodes ricinus*, *Amblyomma maculatum* y *Rhipicephalus microplus*, lo que sugiere que estos podrían ser endosimbiontes obligados de dichas especies de garrapatas (Narasimhan y Fikrig, 2015).

En general, además de los endosimbiontes intracelulares obligados, se observan varios géneros bacterianos con más frecuencia entre varias especies de garrapatas duras, e incluyen *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*. En la Fig. 21 se muestran los géneros bacterianos con una mayor propensión a colonizar las especies de garrapatas (Narasimhan y Fikrig, 2015).



Muchos de estos géneros ponen el reto de diferenciar entre patógenos y endosimbiontes, dada la evidente proximidad genética cuando se estudian las filogenias de varios géneros bacterianos (Fig. 18).



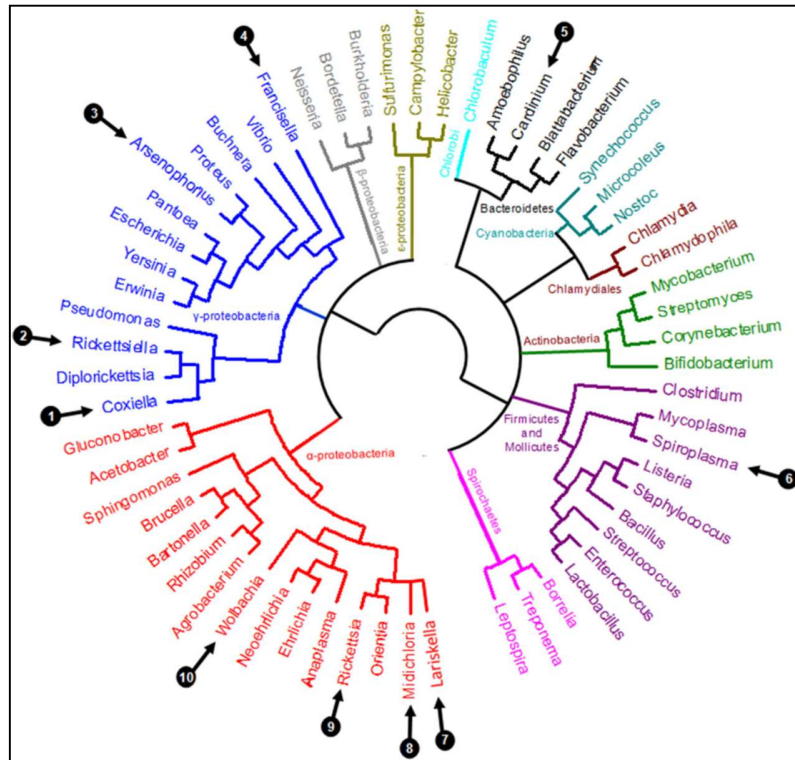
**Figura 20.** Principales géneros bacterianos representativos del microbioma de las garrapatas. Tomada de Narasimhan y Fikrig (2015)

Los mejores ejemplos se encuentran en miembros de los géneros *Rickettsia*, *Francisella* y *Coxiella*, hasta ahora está claro para los ecologistas evolutivos que muchas especies (si no la mayoría) de estos géneros son en realidad, microorganismos no patógenos que exhiben estilos de vida alternativos como simbioses mutualistas en la garrapata y sólo secundariamente sirven como patógenos de los vertebrados (Bonnet *et al.*, 2017).

En el caso del género *Coxiella*, la especie *C. burnetii* se considera principalmente como un patógeno vertebrado, pero numerosas otras especies de *Coxiella* se han encontrado asociadas a garrapatas y son considerados como endosimbiontes, así la naturaleza patógena de *C. burnetii* podría ser una excepción dentro del género. También endosimbiontes relacionados a *Francisella* que se asocian con *Dermacentor* spp. Han sido descritos, pero su potencial patogénico sigue siendo objeto de investigación. Por otro lado, los géneros *Wolbachia* y *Arsenophonus* son bacterias asociadas con artrópodos (en su mayoría insectos) e influyen en la reproducción y / o inmunidad de sus huéspedes. Finalmente, el endosimbionte *Mitochondria* se observó inicialmente en las células ováricas de *I. ricinus*. El uso de sondas moleculares específicas para esta alfa proteobacteria ha demostrado su presencia en casi el 100%



de las hembras *I. ricinus* derivadas de poblaciones naturales y ha sido recientemente implicado como un potencial patógeno vertebrado (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015).



**Figura 21** Filogenia de 10 de los principales géneros de endosimbiontes en garrapatas. Tomada de Bonnet *et al.* (2017)

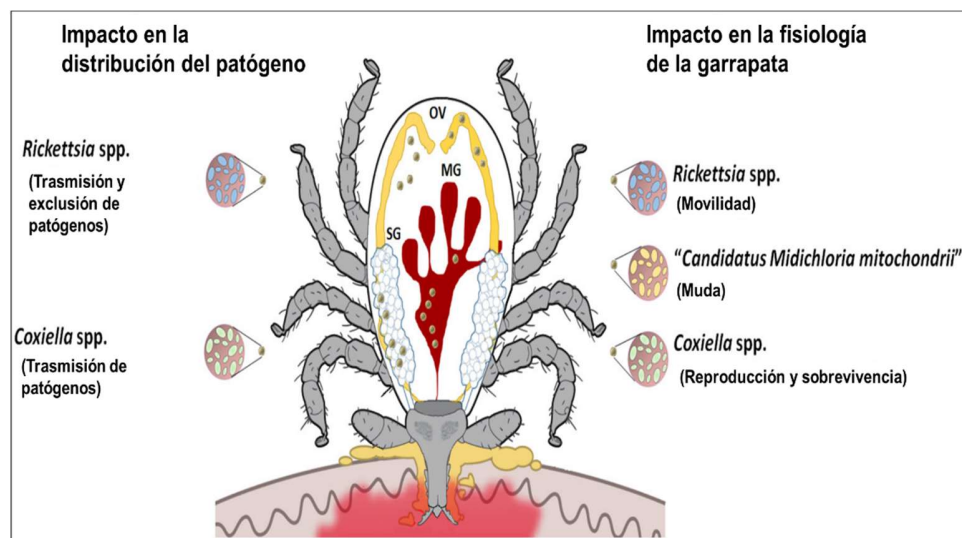
Además de su posible papel importante en la biología de garrapatas, los simbioses de garrapatas también pueden interferir con la transmisión de patógenos (Fig. 19). Por ejemplo, se piensa que los endosimbiontes pertenecientes a los géneros rickettsianos alteran la transmisión de otros patógenos rickettsianos, como se observa en la relación inversa entre la prevalencia de infección de *R. rickettsii* (patógeno) y *R. peacockii* (simbionte) en *Dermacentor andersoni*. La presencia de simbioses relacionados con *Coxiella* en las glándulas salivales de las garrapatas de *Amblyomma*, altera la transmisión de *Ehrlichia chaffeensis* (Moutailler *et al.*, 2016).

Además, Narasimhan *et al.*, (2014) reportaron que la microbiota intestinal de *I. scapularis*, influye en la colonización de *Borrelia burgdorferi*. Al perturbar la microbiota intestinal de las garrapatas larvales, estas mostraron una disminución en expresión del transductor de transcripción y del activador de la transcripción (STAT), lo que resultaba en una menor expresión de peritrofina, una glicoproteína clave de la matriz peritrófica tipo moco (PM) rica en

glicano, que separa el lumen intestinal del epitelio, por lo que la integridad de la PM de *I. scapularis* es esencial para que *B. burgdorferi* colonizara eficazmente el epitelio intestinal.

También se ha reportado que *A. phagocytophilum* induce en las garrapatas la expresión del gen glicoproteína anticongelante de *Ixodes scapularis* (*iafgp*), que codifica para una proteína con varias propiedades, incluida la capacidad de alterar la formación de biofilm bacteriano. IAFGP perturba así la microbiota intestinal de la garrapata, que influye en la integridad de la matriz peritrófica y de la barrera intestinal, obstáculos críticos para la colonización de *Anaplasma* (Abraham *et al.*, 2017).

Descifrar las interacciones entre la garrapata y sus bacterias simbióticas en un contexto ecológico y evolutivo, destacando los procesos co-evolutivos que actúan entre las garrapatas y sus simbioses (ya que algunos tienen una historia evolutiva conjunta de varios millones de años) probablemente revelará nuevos conocimientos y modelos para controlar las enfermedades transmitidas por garrapatas, y permitirá la reevaluación de los riesgos para la salud humana (Bonnet *et al.*, 2017; Narasimhan y Fikrig, 2015).



**Figura 22** Posible impacto del microbioma de la garrapata en la transmisión de patógenos. Tomada de De la Fuente *et al.* (2017)

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas son transmisores de una amplia gama de patógenos de importancia médica y veterinaria, y son consideradas de gran relevancia como vectores, siendo superados a nivel mundial, únicamente por los mosquitos, por lo que es importante definir el microbioma de garrapatas y descifrar sus interacciones con bacterias patógenas para poder revelar nuevos conocimientos acerca del papel del microbioma en las enfermedades transmitidas por garrapatas.

### 4. HIPÓTESIS

Las garrapatas de mamíferos poseen diferentes microorganismos endosimbiontes (microbiota) la cual podría estar asociada a coinfecciones con patógenos de importancia clínica y zoonótica.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

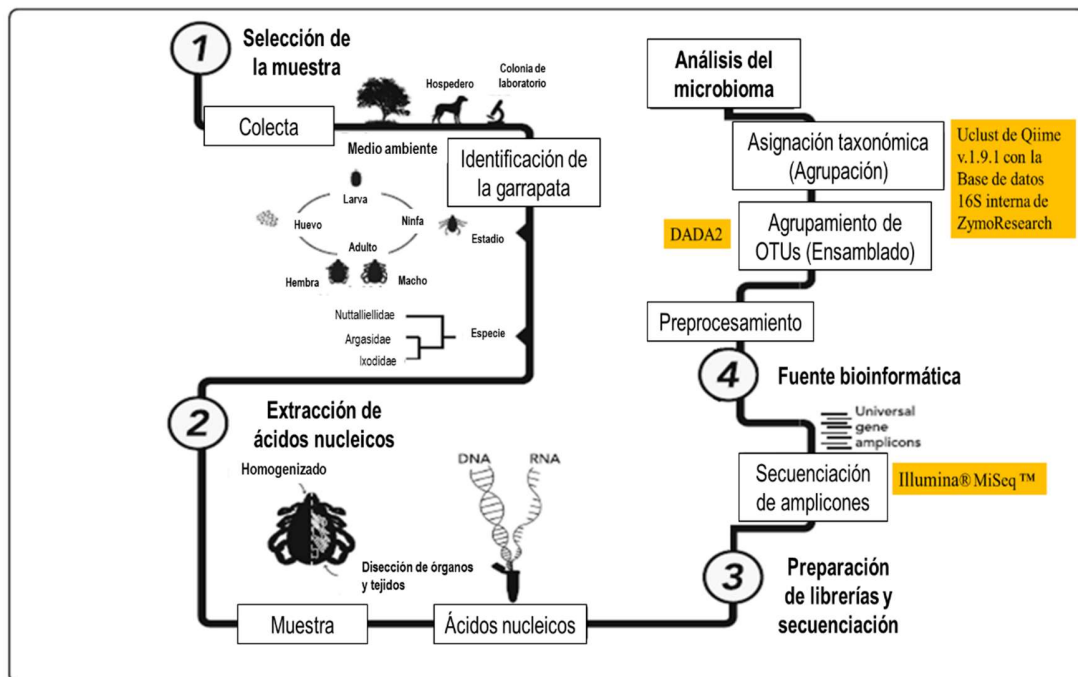
Aislar y caracterizar el microbioma de garrapatas parásitas de mamíferos silvestres, para determinar su correlación con patógenos de importancia clínica y veterinaria.

#### 5.2 Objetivos particulares

- Identificar taxonómicamente las especies de garrapatas presentes en mamíferos silvestres de la región norte del país.
- Identificación por PCR tiempo real de patógenos transmitidos por garrapatas tales como: *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettia rickettsi*, *Ehrlichia chafeensis*, *Borrelia burgdorferi* y *Babesia microti*
- Identificar filogenéticamente las bacterias presentes en el tracto digestivo de las especies de garrapatas colectas de mamíferos silvestres por secuenciación del gen 16s ribosomal.
- Relacionar el microbioma normal de las garrapatas con la presencia de diversos patógenos transmitidos por garrapatas.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Como estrategia general para el presente estudio, se siguió el flujo de trabajo sugerido por Greay *et al.* (2018) resumida en la figura 23.



**Figura 23.** Flujo general de trabajo seguido como estrategia experimental del estudio. Modificada de Greay *et al.* (2018)

### 6.1 Área de estudio

Las colectas se llevaron a cabo en temporadas de caza regulada por las autoridades correspondientes, desde noviembre 2017- febrero 2019, por parte del personal de Organización de Vida Silvestre (O.V.I.S), además de Taxidermia Rodríguez y Taxidermia Internacional, quienes aportaron el material biológico y los datos de las localidades de colecta, por lo que se logró obtener material de los estados de Sonora, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León y Tamaulipas

En el estado de Sonora las colectas se realizaron en: Rancho El Aigame, en el municipio La Colorada (28° 43' 41" N & 110° 26' 5" W) (Dices.net, 1998a) y en Rancho El Plomito (30° 15' 0" N; 112° 22' 12" W) (Dices.net, 1998b), este último desde 1996 se inició un programa de conservación y reproducción de especies de importancia económica en condiciones de semicautiverio, abarcando una superficie de 961 has, y que para 2014 podría contar con una población reproductiva de borrego

cimarrón, venado cola blanca y venado bura para poder realizar las primeras repoblaciones en Sierra El Viejo, Sonora. (O.V.I.S., 2011)

En Tamaulipas las colectas se realizaron en las áreas de Nuevo Laredo (Rancho Santa Clara, N 27°33'0'' W 99°47'59.9'') y Guerrero (Rancho los Columpios, N 26°33'18'' W 99°22'3.7'') (I.N.E.G.I, 2015; I.N.A.F.E.D, 2010; O. C. D. E, n.d.) Para Nuevo León las colectas se fueron en Rancho Mamulique en el municipio de Salinas Victoria. (N 26°7'59.88'' W 100°19'58.799''), Rancho El Retiro (N 27°30'46'' W 100°21'24'') en el municipio de Anáhuac y Rancho El Cibulo (N 27°3'0'' W 100°16'1.199'') en el municipio de Lampazos.(I.N.E.G.I, 2015). En el caso del estado de Chihuahua, los ejemplares se colectaron en el municipio de Ahumada (Tapiecitas, Casas Grandes Chihuahua, N 30°23'44.99'' W 108°12'30.00'') (I.N.E.G.I 2015). Las localidades colectadas en el estado de Coahuila fueron el municipio de Acuña (Rancho El Salado N 29°22' 0.12'' W 102°42'0''), y el municipio de Múzquiz (Rancho Santa Ana, N 28°7'0.12'' W 101°46'58.8'') (I.N.A.F.E.D, 2010)



**Figura 24.** Ubicación Geográfica de las zonas de muestreo

## 6.2 Colecta de garrapatas

El personal de Organización de Vida Silvestre acompañó a los cazadores y retiraron las garrapatas de los hospederos colectados de forma manual o con pinzas por un espacio de 5 minutos de las zonas con más densidad (Orejas, cabeza, cuello , escapula, patas), y de ser posible se mantuvieron vivas hasta el momento de la disección, de lo contrario se preservaron en frascos con alcohol 96% (Amerasinghe *et al.*, 1992) ; de igual manera en las taxidermias se inspeccionaron las pieles que se trasportaron y mantuvieron en refrigeración o congelación, antes de ser sometidas al proceso de conservación. Las garrapatas se procesaron en el Laboratorio de Patología Molecular, del Departamento de Zoología de Invertebrados, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## 6.3 Ficha entomológica

Para la recolección de datos en campo se utilizaron hojas impresas con el siguiente formato:

Fecha	Localidad	Hospedero			Vector									
		Núm.	Especie	Sexo	Estadio			Localización					Especie	
					#♀	#♂	#Ninfas	O	C	Cu	E	P		
								♀						
								♂						

\*C- cabeza, O-oreja, Cu-Cuello, E-Escapula, P-Patas.

## 6.4 Identificación de garrapatas.

La identificación taxonómica se realizó por morfología utilizando las claves de Furman y Loomis (1984), Hoskins (1991) y Walker *et al.* (2014), los ejemplares se observaron en un estereoscopio de 10 X a 40X (EZ4E, Leica Microsystem, Guadalajara, Jalisco, México).

La superficie externa de cada garrapata fue esterilizada según Lucero-Velasco *et al.* (2018). Todas las garrapatas se lavaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, se enjuagaron con etanol al 70% durante aproximadamente 2 min, y luego se enjuagaron tres veces en solución salina durante 1 min, y la cutícula abdominal se secó asépticamente para tomar muestras del tracto digestivo, bajo un

estereoscopio (Leica) usando pinzas esterilizadas y una hoja de bisturí desechable (# 11) en campana de flujo para evitar el riesgo de contaminación cruzada (Molina-Garza y Galaviz-Silva, 2019). La obtención del tracto digestivo de las garrapatas se realizó de acuerdo al método de Edwards *et al.* (2009).

Para determinar los índices de densidad de garrapatas por hospederos, se realizaron medidas de prevalencia, abundancia e intensidad utilizando los criterios de (Bush *et al.*, 1997; Pagano, 1999)

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Hospederos infestados}}{\text{Total de hospederos}} \times 100$$

$$\text{Abundancia} = \frac{\text{Total de garrapatas colectadas}}{\text{Total de hospedero}}$$

$$\text{Intensidad} = \frac{\text{Total de garrapatas colectadas}}{\text{Hospederos infestados}}$$

Se determinó la asociación significativa entre el vector y la ubicación del hospedero, entre el sexo de las garrapatas y localidad mediante tablas de contingencia y análisis de Chi cuadrada ( $\chi^2$ ). El nivel de significancia fue calculado con el 95 % de intervalo de confianza (IC) ( $P < 0.05$ ). Además, los datos se analizaron con la prueba Z para comparación de proporciones poblacionales con el programa del SPSS versión 17 (Chicago, IL).

### **6.5 Extracción del ADN a partir de garrapatas.**

Las muestras de tracto digestivo se colocaron inmediatamente en tubos Eppendorf esterilizados en pools de máximo 10 garrapatas de la misma localidad, especie y sexo, y se mantuvieron a 4 °C para la extracción de ADN, la cual se realizó mediante el protocolo del DNAzol® (Molecular Research Center, Inc. 2001) de la siguiente manera: las muestras y DNAzol en una proporción de Se incubaron 1: 1 durante 24 horas a 4 °C en tubos Eppendorf de 1,5 ml, después de lo cual se añadió cloroformo en una proporción de 1: 2 y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se añadió etanol absoluto frío al sobrenadante en una proporción de 1: 1, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, se

centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante; después de esto, se realizaron dos lavados más con 300 µl de etanol frío al 70%, se dejó secar el exceso de alcohol del tubo a temperatura ambiente durante 15 min, se agregaron 100 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó el extracto de ADN con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se almacenó a - 20 ° C (Galaviz-Silva *et al.*, 2013).

## 6.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se realizó el diagnóstico de patógenos presentes en el tracto digestivo de las garrapatas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real basados en sondas Taqman T4 Oligo ®, que se describen en la tabla 9.

**Tabla 8.** Cebadores y sondas utilizados para el diagnostico de patógenos transmitidos por garrapatas

Especie	Gen	Oligonucleótido	Amplicon (pb)	Referencia
<i>Borrelia burgdorferi</i>	ospA	F- AATATTTATTGGAATAGGTCTAA R- CACCAGGCAAATCTACTGA P- TTAATAGCATGYAAGCAAAATGTTAGC-FAM	102	(Briciu et al., 2016)
<i>Rickettsia spp.</i> (grupo de las fiebres manchadas)	gltA	F- TCGCAAATGTTACGGTACTTT R- TCGTGCATTCTTTCCATTGTG P- TGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATG-FAM	74	(Quarsten et al., 2015)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ank	F- GTGTTGTAGAAGCTGGGGCAC R- GCCTCATTGCGGCTTGAA P- TACTCCTACCGGATCTATGAGC-FAM	84	(Stephenson et al., 2015)
<i>Babesia microti</i>	18SrRNA	F- CGCGTGGCGTTTATTAGACTT R- CAAA GCCATGCGATTGCG P- CCAACCCCTCGGGTAATCGGTGATTC-FAM	89	(Wang et al., 2015)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	dsb	F TTGAGAAGCATCACTGAAAGC R GCAGCATGGTAGAACTCGATGTA TCAAGCAGCACTAGCAGTACATCTAATAA ACCCAAGTAA- FAM	88	(Wroblewski et al., 2017)



**Tabla 9** Oligonucleotidos sintetizados como controles positivos de enfermedades transmitidas por garrapatas.

ESPECIE	OLIGONUCLEOTIDO	Tamaño (pb)	GenBank
<i>Erlichia chaffensis</i>	TTTCCAATACTTGGAGAAGCATCACTGAAAGCTGTTCAAGCAGCACTAG CAGTACATCTAATAAACCAAGTAAATACATCGAGTTCTACCATGCTGCAC TAAACCATAA	110	AF403711
<i>Borrelia burgdorferi</i>	TATATTATGAAAAAATATTATTGGGAATAGGTCTAATATTAGCCTTAATAG CATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGACGAGAAAAACAGCGTTTCAGT AGATTTGCCTGGTGAAATGAAAGTTCTTG	130	CP0096571
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	AGCATTTAAAGCGTGTGTAGAAAGCTGGGGCACATATAAATACTCTACC GGATCTATGAGCCCTTTAGCTGCTGCAGTTCAAGCGGCAATGAGGCAA GTAACCTTAA	110	GU2368081
<i>Rickettia spp.</i> (Grupo de las fiebres manchadas)	GCTATGGGTATACCGTCGCAAATGTTACGGTACTTTTGAATAGCAAG AACCGTAGGCTGGATGGCACAATGGAAAGAAATGCACGAAGACCCTGA AC	100	KU8530231
<i>Babesia microti</i>	TCGAGGCGCGTTTTCGCGTGGCGTTTATTAGACTTTAACCAACCCTTCGG GTAATCGGTGATTCAATAAATTAGCGAATCGCATGGCTTTGCCGGCGA TGTATCATTC	110	AB1904591

En cada ensayo se usó un volumen total de 10µl de reacción 5µl de TaqmanUniversal Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA), 0.5 µl de mix de primer y sonda T4 Oligo ®, 2 µl de muestra o control y se completó el volumen con 2.5µl. y se probaron las concentraciones: 1X, 5X y 10X, de primers y sondas, y las concentraciones de Universal Master mix de 1X y 2X, para optimizar los ensayos.

La amplificación se realizó en un equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) en el cual se usaron las condiciones de termociclado mostradas en la Tabla 11.

**Tabla 10.** Condiciones de termociclado para qPCR de patógenos transmitidos por garrapatas.

Especie	Condiciones de termociclado	Referencia
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	50 °C (2 min), 95 °C (10 min), 50 ciclos a 95 °C (15 s), seguido por 60 °C (1 min)	(Stephenson et al., 2015)
<i>Erlichia</i>	94 °C (5 min) 40 ciclos a 94 °C (1min), seguido por 60 °C(1min) y 72 °C (1min); Extension final: 5 min a 72 °C	(Carrillo-Bonilla et al., 2014)
<i>Rickettia spp</i>	50 °C (3 min), 95°C (5 min) 60 ciclos a 95°C (20 s) seguido por 60°C (40s)	(Stenos et al., 2018)
<i>Babesia</i>	50°C (2 min),95°C (10 min), 45 ciclos 95° (20 s) seguido por 55°C (1 min).	(Yokoyama et al., 2018)
<i>Borrelia</i>	95 °C (10min), 35 ciclos a 95 (15s), seguido por 52 °C (1min) y 42 °C (1min)	Sugerido por: Termofisher Tm calculator: <a href="https://www.thermofisher.com/mx/">https://www.thermofisher.com/mx/</a>

La linealidad de los resultados de los ensayos de qPCR fue evaluada a partir de la eficiencia de las reacciones de PCR de las curvas estándar y por los parámetros: pendiente, intercepción, y el coeficiente de regresión ( $R^2$ ), se determinó la eficiencia de reacción mediante la siguiente fórmula:

$$E_x = 10^{(-1/m)} - 1$$

Dónde:  $E_x$  es la eficiencia de reacción y  $m$  la pendiente de la curva (Life Technologies Corporation., 2012).

Las concentraciones obtenidas de los controles positivos se convirtieron a número de copias (NC) usando la siguiente fórmula:

$$CN/\mu L = \text{Conc. (g}/\mu L) \times NA / MW \text{ (g/mol)}$$

Dónde: NA es la constante de Avogadro ( $6.022 \times 10^{23}$  copias/mol) y MW es el peso molecular de cada par de nucleótidos (650) multiplicado la longitud de cada T4 Oligo® usado como control (tabla 2) (Obregón *et al.*, 2016).

## **6.7 Caracterización del microbioma intestinal**

Para la caracterización del microbioma de las garrapatas, se enviaron parte de las extracciones a ZymoBIOMICS® para la secuenciación de la región de DNA que codifica para 16s ribosomal, en búsqueda de los principales grupos y especies bacterianas simbioses presentes en tracto digestivo de las garrapatas.

Preparación de la biblioteca dirigida: La secuenciación del gen de ARN ribosomal bacteriano 16S se realizó usando el kit de preparación de biblioteca Quick-16S™ NGS (Zymo Research, Irvine, CA). Los primer bacterianos 16S amplificaron la región V1-V2 o V3-V4 del gen 16S rRNA. Estos primer fueron diseñados por Zymo Research para proporcionar la mejor cobertura del gen 16S manteniendo una alta sensibilidad.

La biblioteca de secuenciación se preparó mediante PCR tiempo real para controlar los ciclos y evitar la formación de quimeras. Los productos finales se cuantificaron y se agruparon en base a su molaridad. La biblioteca final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA), luego se cuantificó con TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA).

- Secuenciación: la biblioteca final se secuenció en Illumina® MiSeq™ con un kit de reactivos v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con > 10% de aumento de PhiX.
- Análisis bioinformático: Se infirieron amplicones de secuencias únicas y quiméricas a partir de lecturas crudas utilizando DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). La asignación de taxonomía se realizó utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1 con la Base de datos 16S interna de ZymoResearch. Los análisis de visualización de composición, diversidad alfa y diversidad beta se realizaron con Qiime v.1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010). Si corresponde, LEfSe (Segata *et al.*, 2011) identificó la taxonomía que tiene una abundancia significativa entre los diferentes grupos mediante la configuración predeterminada. Otros análisis, como mapas de calor, Taxa2SV\_decomposer y gráficos de PCoA se realizaron con scripts internos.

Para establecer la correlación entre los microbiomas se tomaron como muestras independientes las garrapatas no infectadas y las garrapatas que fueron positivas para algún patógeno, se realizó una tabla de frecuencias, para posteriormente usar la prueba de *chi* cuadrada como prueba estadística, con una  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

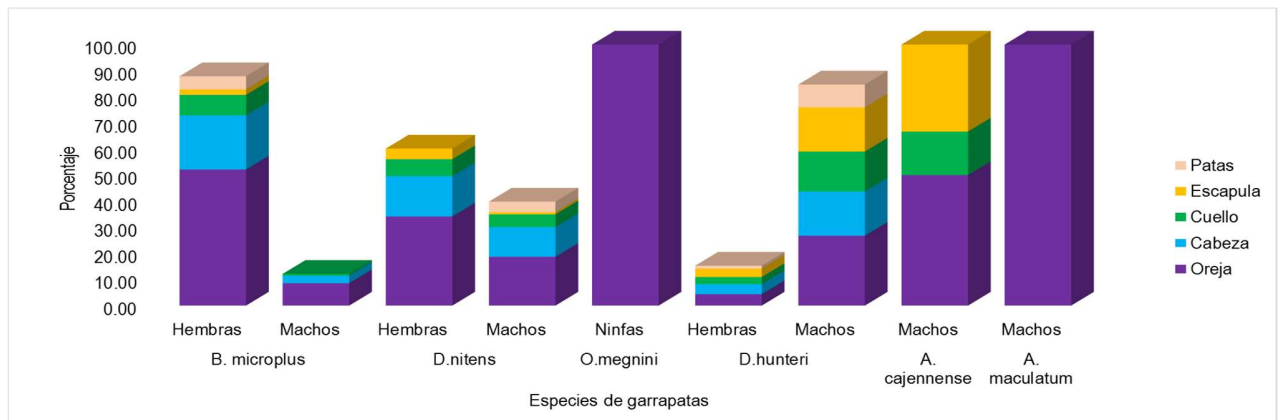
### 6.1 Identificación taxonómica del vector

En las localidades muestreadas del norte de la República Mexicana, se inspeccionaron un total de 300 hospederos: 296 venados de los cuales 56/296 (19.26 %) estaban infestados, y 4/4 (100%) borrego cimarrón estaban infestados. Se colectaron un total de 475 garrapatas pertenecientes a 4 especies distintas: *R. microplus*, *D. nitens*, *O. megnini*, *D. hunteri*, además de especímenes que pertenecían a los complejos de *Amblyomma cajenennse* y *A. maculatum*. En cuanto a la prevalencia, abundancia e intensidad de las garrapatas de venado, *R. microplus* presentó la mayor con el 30.9 %, 0.49 y 2.88, respectivamente; pero en borrego cimarrón, *D. hunteri* es la que más sobresale; los datos obtenidos se muestran resumidos en la Tabla 12.

La distribución corporal de las garrapatas en los hospederos, en general, fue mayor en las orejas con un total de 233 (49.05 %) garrapatas de las seis especies (25.90 %, total de hembras, 18.73 % de machos y 4.42% de ninfas) y la parte superior de la cabeza con 104 (21.89%) ejemplares de las 6 especies (11.57 hembras, 10.32 % machos), seguidas por el cuello donde se hallaron 60 (12.63%) ejemplares (5.05% hembras y 7.58% machos), en la escapula se obtuvieron 48 (10.11%) garrapatas, de estas 2.95% fueron hembras y 7.16% machos; y en las extremidades inferiores se colectaron 30 (6.32%) garrapatas (1.89% hembras y 4.43% machos). En la fig. 25 se muestra la distribución corporal de cada una de las diferentes especies de garrapata colectadas, que al analizarla, sin importar hospedero y localidad, presentaron asociación altamente significativa, en todos los estadios ( $X^2=44.53$ ,  $P<0.001$ ) y a pesar de que las ninfas *O. megnini* se localizaron exclusivamente en las orejas, también las hembras y machos de las diferentes especies de garrapatas se asociaron significativamente con la ubicación corporal ( $X^2=21.29.5$ ,  $P<0.001$ ). Se encontró mediante ANOVA y posterior prueba de Tukey que las distintas especies de garrapatas preferían alimentarse de manera significativa en las orejas, cabeza y cuello ( $p< 0.05$ ) con respecto a la escapula o patas del cuerpo del hospedero donde se colectaron.

**Tabla 11.** Datos obtenidos en las colectas del norte de la República Mexicana

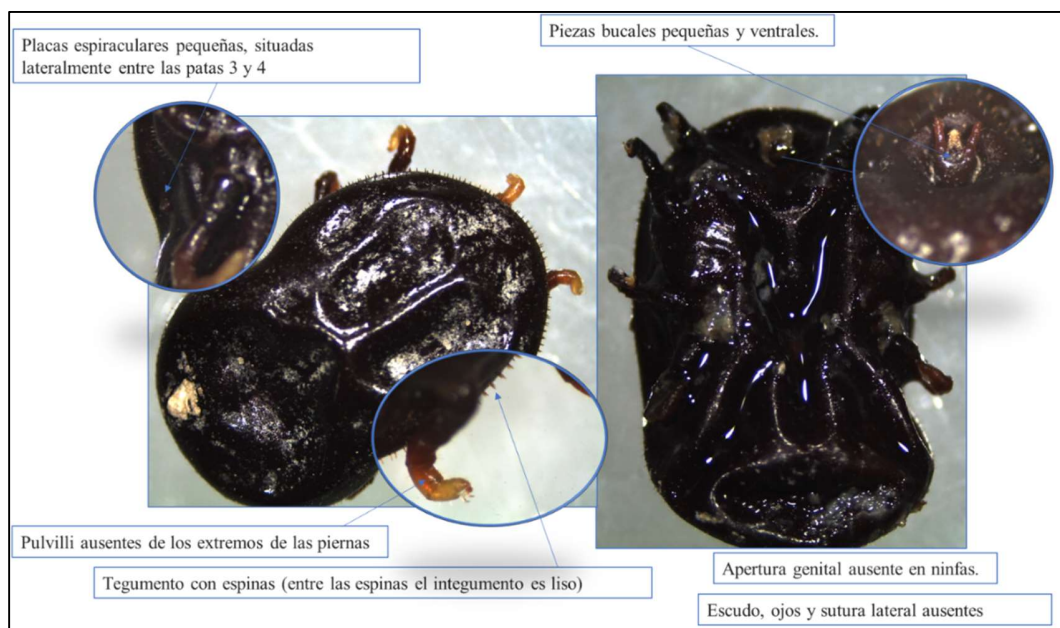
	Nuevo León			Sonora			Tamaulipas	Chihuahua		Coahuila		
Hospedero	O. virginianus (%)			O. virginianus (%)	O. canadensis (%)		O. virginianus (%)	O. virginianus (%)		O. virginianus (%)		
N de hospederos	32/224 (13.9)			6/16 (37.5)	4/4 (100)		6/15 (40)	5/18 (27.78)		7/23 (30.43)		
Especies	R. microplus	D. nitens	A. cajenennse	O. megnini	D. hunteri	O. megnini	R. microplus	D.mitens	R. microplus	D.nitens	R.microplus	A. maculatum
No. garrapatas	101/176 (57.39)	69/176 (39.20)	6/176 (3.41)	19/204 (9.3)	183/204 (89.7)	2/204 (0.98)	17/17 (100)	22/34 (64.71)	12/34 (35.29)	32/44 (72.73)	10/44 (22.73)	2/44 (4.54)
Ninfas	--	--		19/204 (9.3)	--	2/204 (0.98)	--	--	--	--	---	--
♀	87/176(49.43)	30/176 (17.05)	--	--	28/204 (13.7)		13/17(76.5)	17/34 (50.0)	12/34 (35.29)	27/44 (61.36)	10/44 (22.73)	--
♂	14/176 (7.95)	39/176 (22.16)	6/176 (3.41)	--	155/204 (76)		4/17(23.5)	5/34 (14.71)	--	5/44 (11.36)	--	2/44 (4.55)
Abundancia	0.786			10.2			1.13	1.89		1.91		
Intensidad	5.5			20.4			2.83	6.8		5.5		
TOTALES												
Total de hospederos (%)	60/ 300 (20.30%)											
Total garrapatas	475											
Ninfas (%)	21/475 (4.42%)											
♀ (%)	224/475 (47.16%)											
♂ (%)	230/475 (48.42%)											
Abundancia	1.58											
Intensidad	7.79											



**Figura 25.** Distribución corporal de las distintas especies de garrapatas colectadas

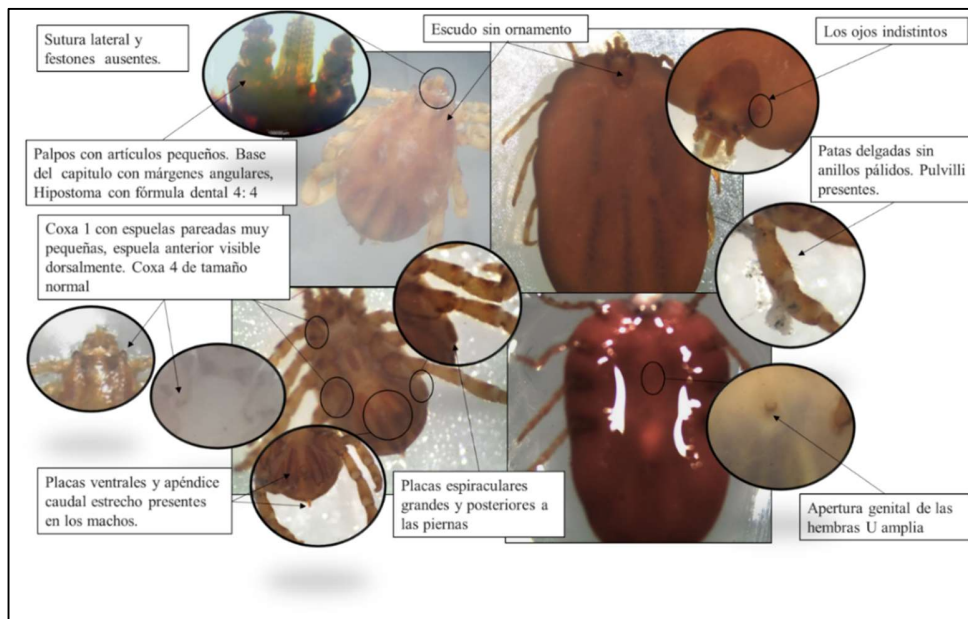
Se realizó la identificación taxonómica de las especies colectadas por morfología según las claves taxonómicas de Keirans y Litwak (1989); Walker *et al.* (2014) en las cuales se mencionan que las siguientes estructuras son clave para cada una de las especies colectadas en este estudio.

### 7.1.1 *Otobius megnini*



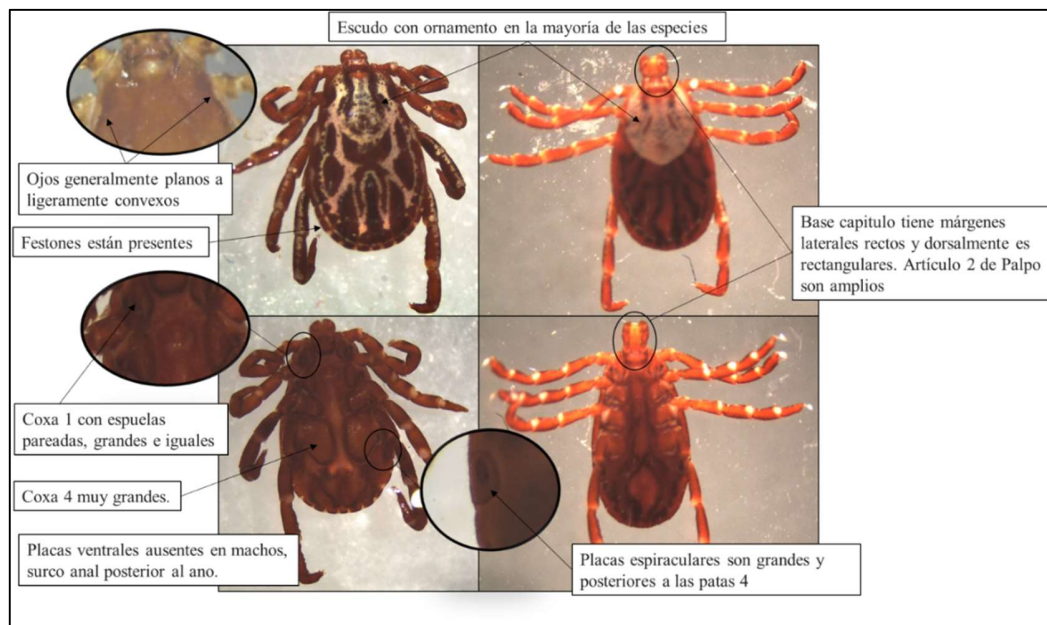
**Figura 26.** Características taxonómicas de *Otobius megnini* (Walker *et al.*, 2014)

## *Boophilus microplus*



**Figura 27.** Características morfológicas para la identificación taxonómica de *Boophilus microplus* (Walker *et al.*, 2014)

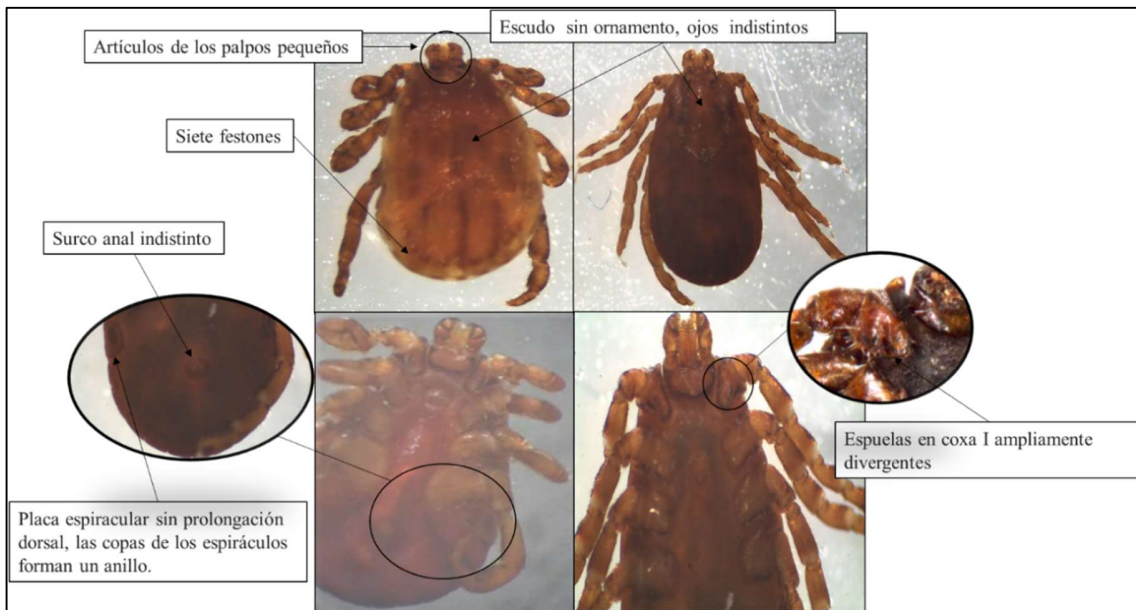
### 7.1.2 Género *Dermacentor*



**Figura 28** Características morfológicas para la identificación taxonómica del género *Dermacentor* sp. (Walker *et al.*, 2014)

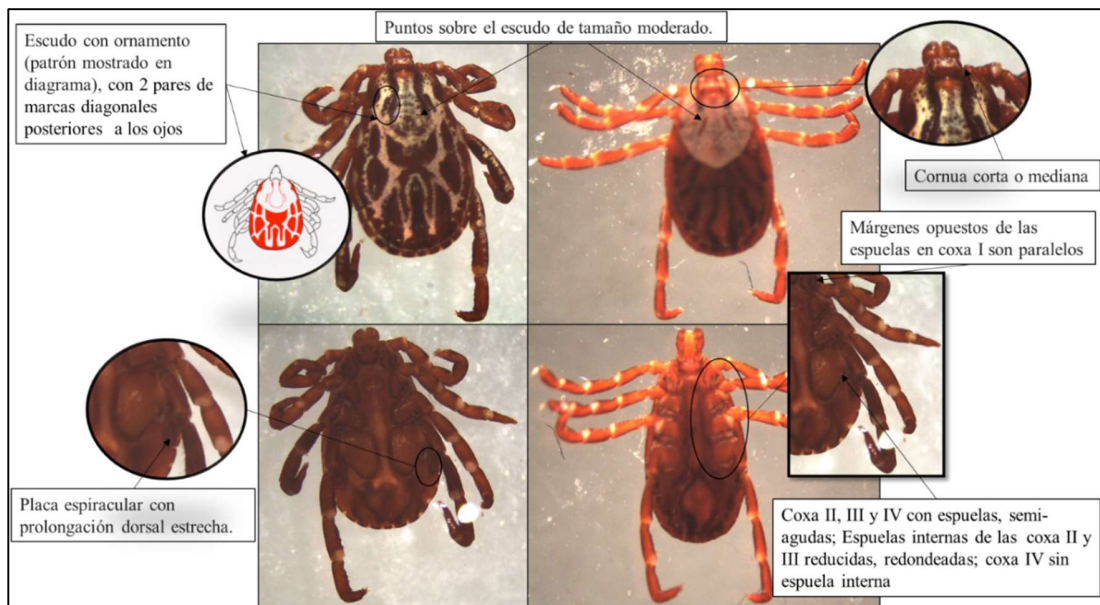


### 7.1.2.1 *Dermacentor nitens*



**Figura 29** Características morfológicas para la identificación taxonómica de *D. nitens* (Hoskins, 1991; Walker *et al.*, 2014)

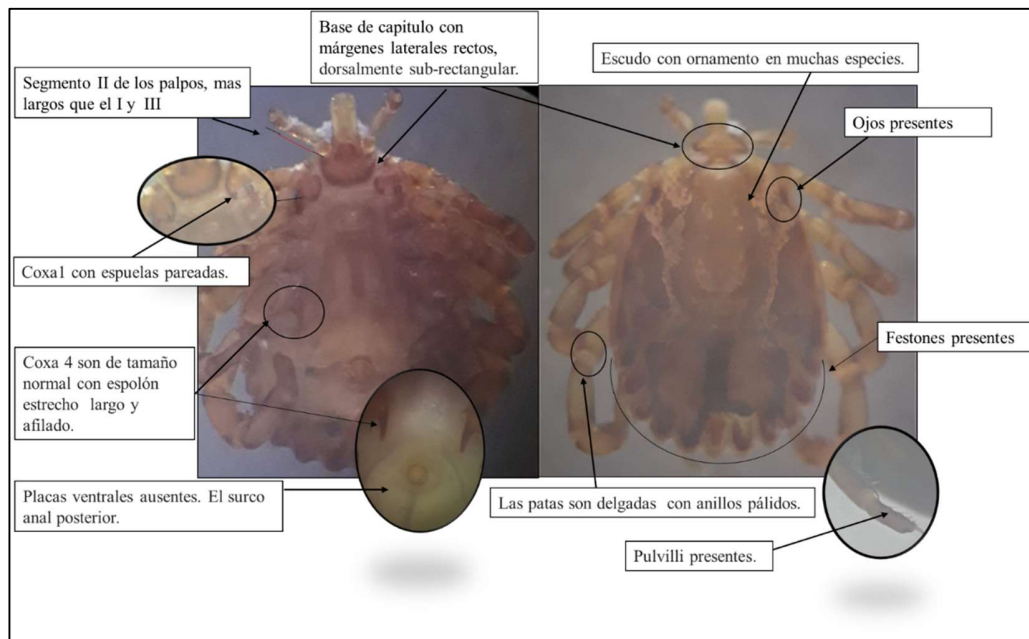
### 7.1.2.2 *Dermacentor hunteri*



**Figura 30** características morfológicas para la identificación taxonómica de *D. hunteri*. (Furman y Loomis, 1984; Hoskins, 1991)

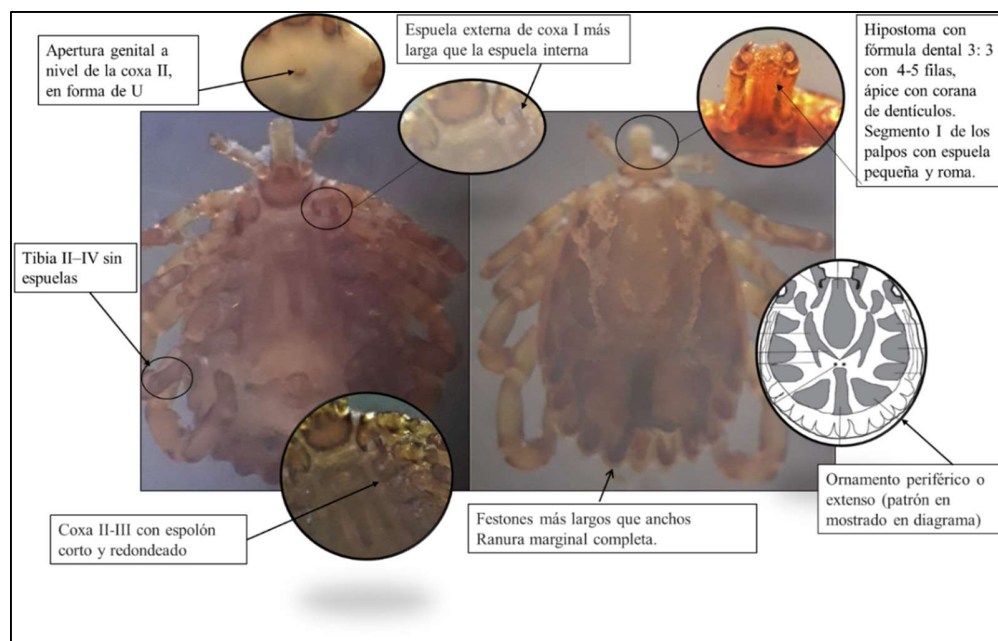


### 7.1.3 Género *Amblyomma*



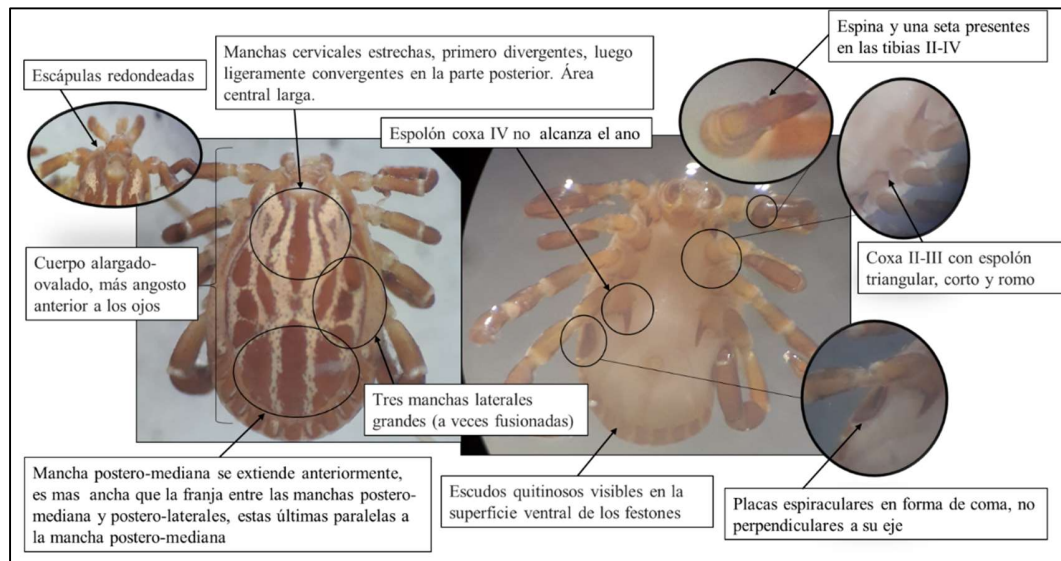
**Figura 31** Principales características morfológicas para la identificación taxonómica del género *Amblyomma*. (Walker *et al.*, 2014)

#### 6.1.4.1 Complejo *Amblyomma cajennense*



**Figura 32** Características morfológicas para la identificación de especies del complejo *A. cajennense* (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2011; Nava *et al.*, 2014)

#### 6.1.4.2 Complejo *Amblyomma maculatum*



**Figura 33** Características morfológicas para la identificación taxonómica de especies del complejo *A. maculatum* (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2011; Lado *et al.*, 2018)

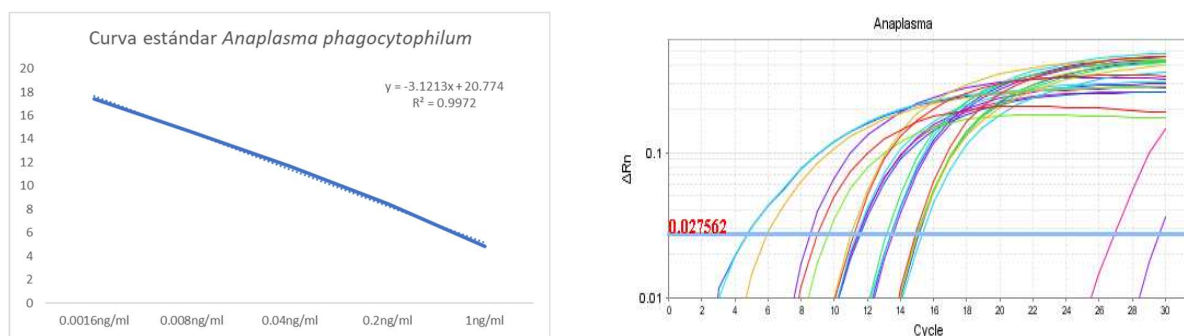
## 7.2 qPCR para la cuantificación por curva estándar de patógenos transmitidos por garrapatas

En el caso de los patógenos estudiados, las concentraciones que mostraron mejor eficiencia de reacción fueron: primer y sonda a 5x y de universal master mix fue a 2x. En el caso de *R. rickettsi* la eficiencia de reacción fue de 98.15%, para *A. phagocytophilum* fue de 108.9%, para *Ehrlichia chaffeensis* fue de 109.8%, *B. burgdorferi* mostro una eficiencia de 110.3% y finalmente la eficiencia para *B. microti* fue de 109.17%. El resultado de la cuantificación de los controles positivos para cada patógeno se resume en la Tabla 13

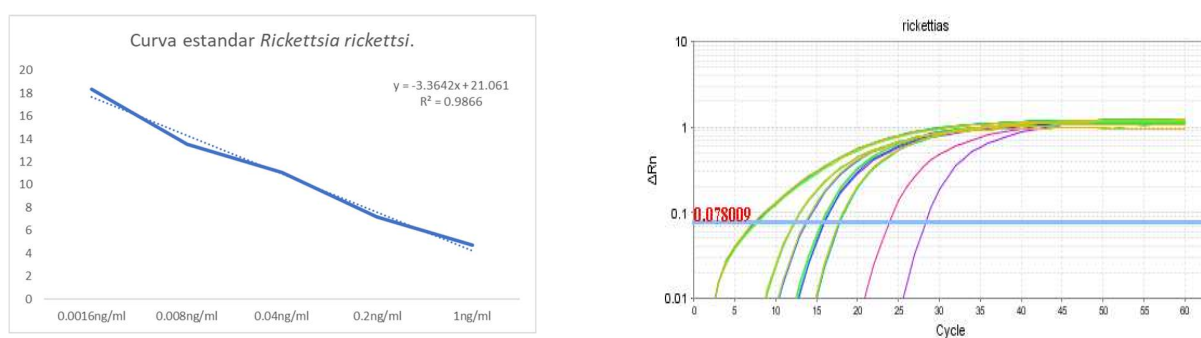
**Tabla 12.** Cuantificación de controles positivos para patógenos transmitidos por garrapatas

Patógeno	Cq media	ng/ml	No de copias/ ml (Nc/ml)	Limite detección (estándar 0.0016ng/ml)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	8.69	0.2044	$1.72 \times 10^9$	$1.35 \times 10^7$ Nc/ml
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	7.2	0.185	$1.56 \times 10^9$	$1.35 \times 10^7$ Nc/ml
<i>Rickettsia rickettsi</i>	12.835	0.0076	$7.0411 \times 10^7$	$1.482 \times 10^7$ Nc/ml
<i>Borrelia burgdorferi</i>	13.89	0.0391	$2.79 \times 10^8$	$1.14 \times 10^7$ Nc/ml
<i>Babesia microti</i>	12.48	0.0392	$3.30 \times 10^8$	$1.35 \times 10^7$ Nc/ml

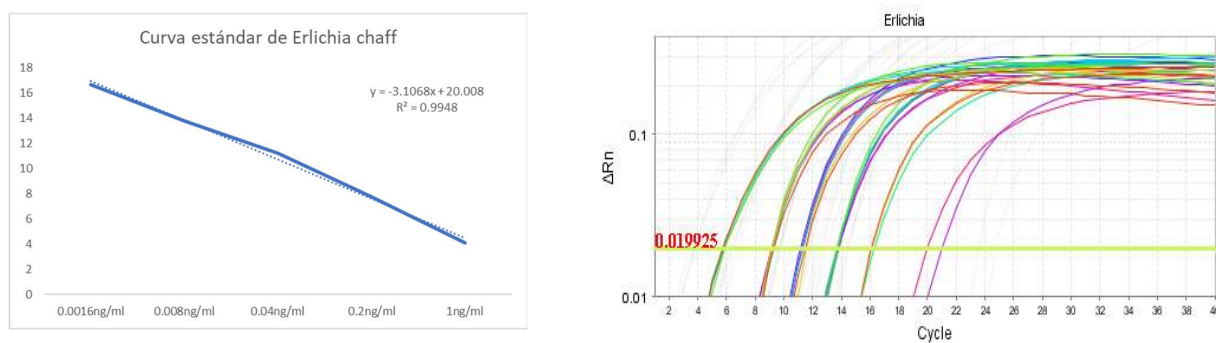
En las siguientes figuras se muestran las curvas estándar para cada ensayo junto con los datos de pendiente, intersección y  $R^2$ , además de su grafica de amplificación.



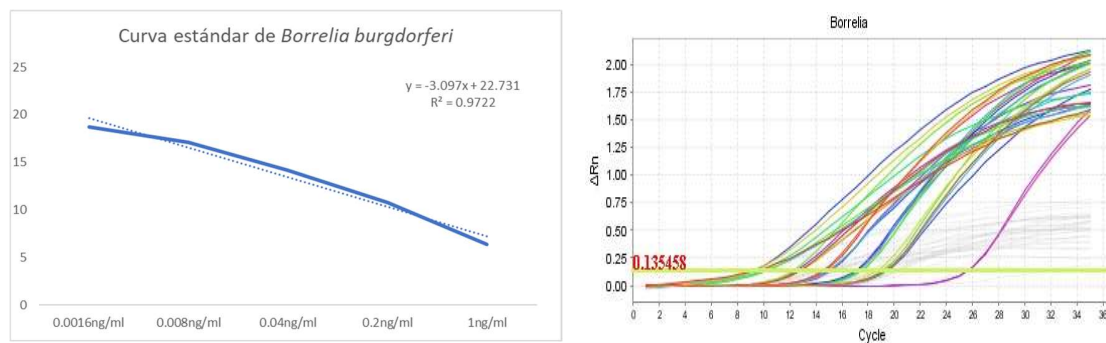
**Figura 34.** Curva estándar y gráfica de amplificación para *Anaplasma phagocytophilum*



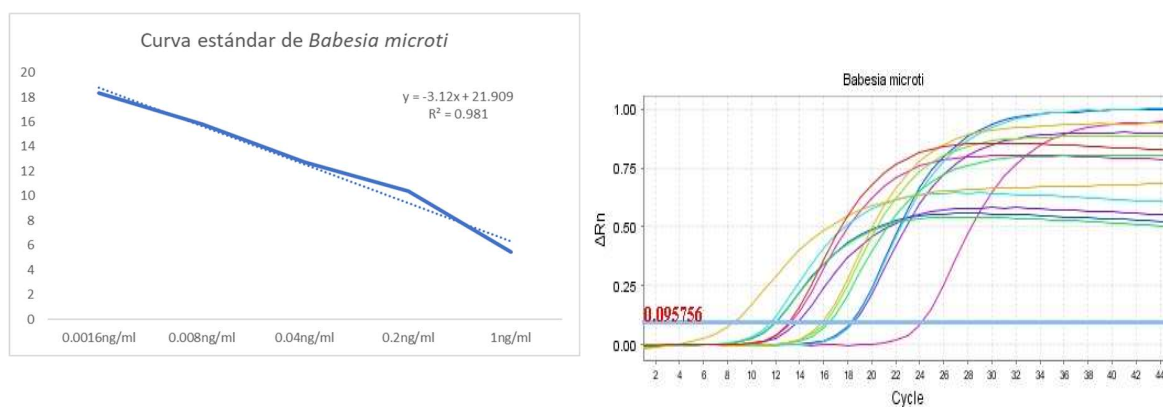
**Figura 35.** Curva estándar y grafica de amplificación para *Rickettsia rickettsi*



**Figura 36.** Curva estándar y gráfica de amplificación para *Erlichia chaffensis*



**Figura 37.** Curva estándar y gráfica de amplificación para *Borrelia burgdorferi*



**Figura 38.** Curva estándar y gráfica de amplificación para *Babesia microti*

Se realizó la cuantificación de los 5 patógenos en las muestras de garrapatas colectadas de venado cola blanca, bajo las condiciones descritas, las cuales dieron  $< 0.0016\text{ng/ml}$ , es decir por debajo de  $1 \times 10^7$  Nc/mL.

### 6.3 Caracterización de microbioma de las especies de garrapatas colectadas.

Se comparó la composición del microbioma de las garrapatas obtenidas se realizó por hospedero, localidad, especies y sexo.

### 6.4 Venado cola blanca

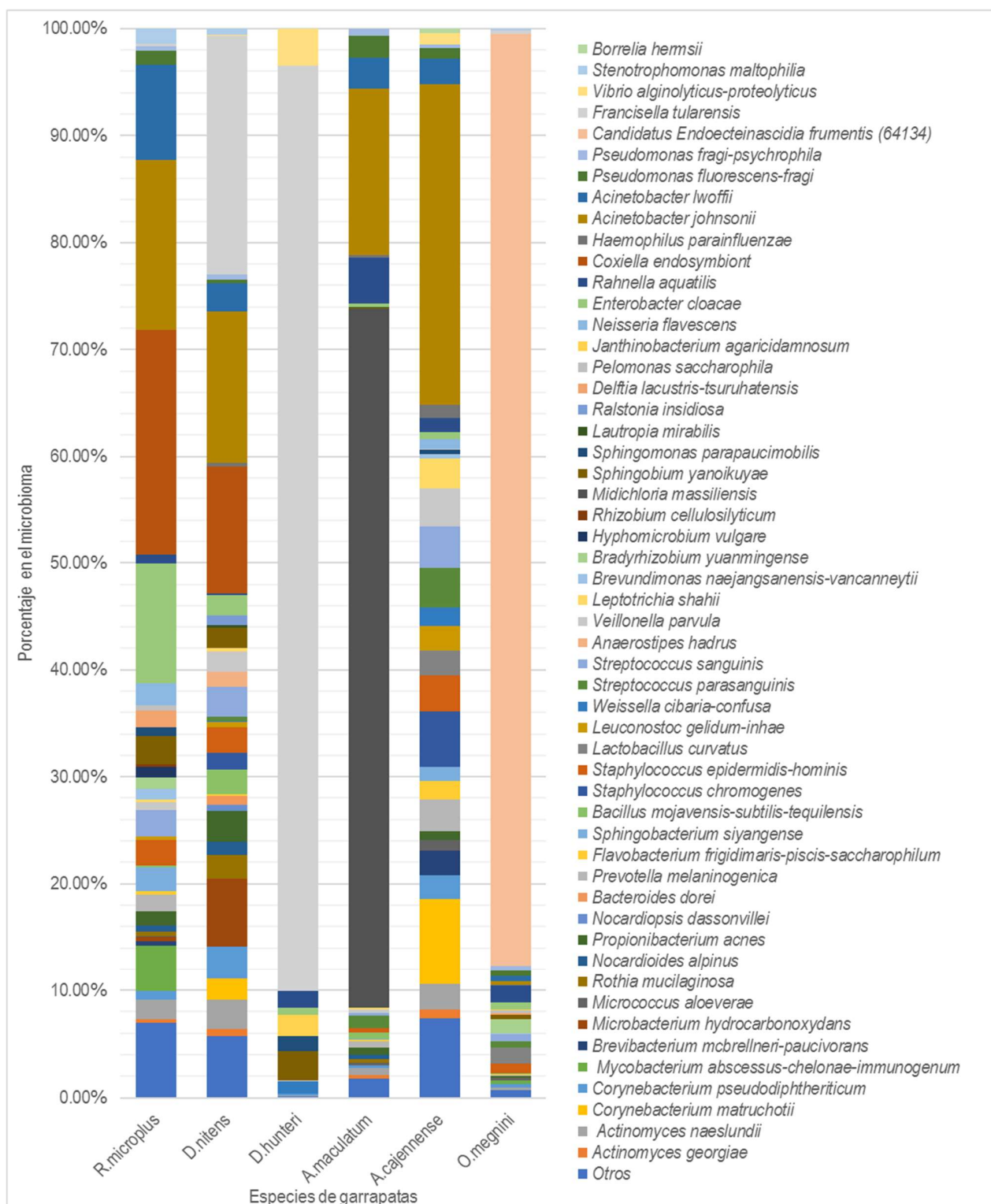
Para este hospedero se observó que, en todas las especies de garrapatas capturadas, el phylum predominante fue el de Proteobacterias, seguido por los phylum Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Fusobacteria, respectivamente. Dentro de las proteobacterias, la clase Gammaproteobacteria fue la principal en la mayoría de las especies de garrapatas, seguida de las clases Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria; los principales órdenes en la mayoría de las especies fueron Pseudomonadales y Thiotrichales, lo anterior se resume en la tabla 14 y la fig.36 muestra el gráfico de las principales especies bacterianas que pertenecen al microbioma de cada especie de garrapata. Según los índices de alfa diversidad de Shannon, las especies con mayor diversidad en su microbioma son *R. microplus*, *D. nitens* y *A. maculatum* (Tabla 15). Se realizó un análisis SIMPER para obtener las principales familias que contribuyen en las diferencias entre las especies de garrapatas, esto se muestra en la Tabla 16.

Dado que *R. microplus* y *D. nitens* fueron recolectadas de ambos sexos y se encontraron en todas las localidades, los microbiomas de estas las especies se compararon por sexo o localidad. Las hembras de *R. microplus* presentaron una mayor diversidad que los machos, mientras que en *D. nitens* ocurrió lo contrario; en el caso de las localidades, en ambas especies, Nuevo León presentó la mayor diversidad de especies bacterianas, seguido de Coahuila y Chihuahua (Tabla 15). La composición de especies bacterianas presentes según el sexo de la garrapata se muestra en la fig. 40, mientras que en la fig. 41 esta composición se indica por localidad donde fueron obtenidas las garrapatas.

**Tabla 13.** Principales ordenes bacterianos encontrados en las especies de garrapatas colectadas de venado

Clasificación	Porcentaje (%)					O
	<i>R. microplus</i>	<i>D. nitens</i>	<i>D. hunteri</i>	<i>A. maculatum</i>	<i>A. cajenense</i>	
<b>Actinobacteria</b>	10.40	21.70	0.30	2.90	17.50	
<b>Actinobacteria</b>						
Actinomycetales	1.70	3.00	0.10	1.00	3.20	
Bifidobacteriales	0.40	0.40	0.00	0.00	0.00	
Corynebacteriales	5.10	5.00	0.20	0.20	10.20	
Micrococcales	1.30	8.60	0.00	0.60	3.30	
Propionibacteriales	1.90	4.10	0.00	1.10	0.80	
Streptosporangiales	0.00	0.60	0.00	0.00	0.00	
<b>Bacteroidetes</b>	4.10	1.0	0.00	0.80	6.0	
<b>Bacteroidia</b>						
Bacteroidales	1.60	0.80	0.00	0.50	3.00	
<b>Flavobacteriia</b>						
Flavobacteriales	0.30	0.20	0.00	0.20	1.70	
<b>Firmicutes</b>	6.10	13.30	1.20	2.70	26.10	
<b>Bacilli</b>						
Bacilliales	2.60	6.30	0.00	1.00	8.60	
Lactobacillales	2.80	3.70	1.10	1.40	13.90	
<b>Clostridia</b>						
Clostridiales	0.20	2.80	0.00	0.00	0.00	
<b>Negativicutes</b>						
Selenomonadales	0.50	0.50	0.10	0.30	3.60	
<b>Fusobacterias</b>	0.30	0.30	0.00	0.20	2.80	
<b>Fusobacteriia</b>						
Fusobacteriales	0.30	0.30	0.00	0.20	2.80	
<b>Proteobacteria</b>	72.10	58.0	98.40	91.60	39.80	
<b>Alphaproteobacteria</b>						
Calculobacteriales	1.00	0.00	0.00	0.00	0.40	
Rhizobiales	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	
Rickettiales	0.00	0.00	0.00	65.40	0.00	
Sphingomonadales	3.40	1.90	4.00	0.10	0.40	
<b>Betaproteobacteria</b>						
Burkholderiales	2.10	1.20	2.10	0.10	0.10	
Neisseriales	2.00	0.00	0.00	0.00	0.90	
<b>Gammaproteobacteria</b>						
Alteromonadales	2.40	0.00	0.40	0.00	0.00	
Enterobacteriales	9.70	2.00	1.90	4.60	1.90	
Legionellales	21.00	12.00	0.00	0.00	0.00	
Pasteurellales	0.00	0.30	0.00	0.20	1.20	
Pseudomonadales	26.50	17.60	0.00	21.20	33.80	
Thiotrichales	0.30	22.30	86.50	0.00	0.00	
Vibrionales	0.00	0.10	0.00	0.00	1.10	
Xanthomonadales	1.40	0.60	3.50	0.00	0.00	
<b>Spirochaetae</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	
<b>Spirochaetes</b>						
Spirochaetales	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	





**Figura 39.** Principales especies bacterianas que conforman el microbioma de las especies de garrapatas colectadas de venado

**Tabla 14.** Índices de Shannon de alfa diversidad por especie de garrapata, localidad y sexo.

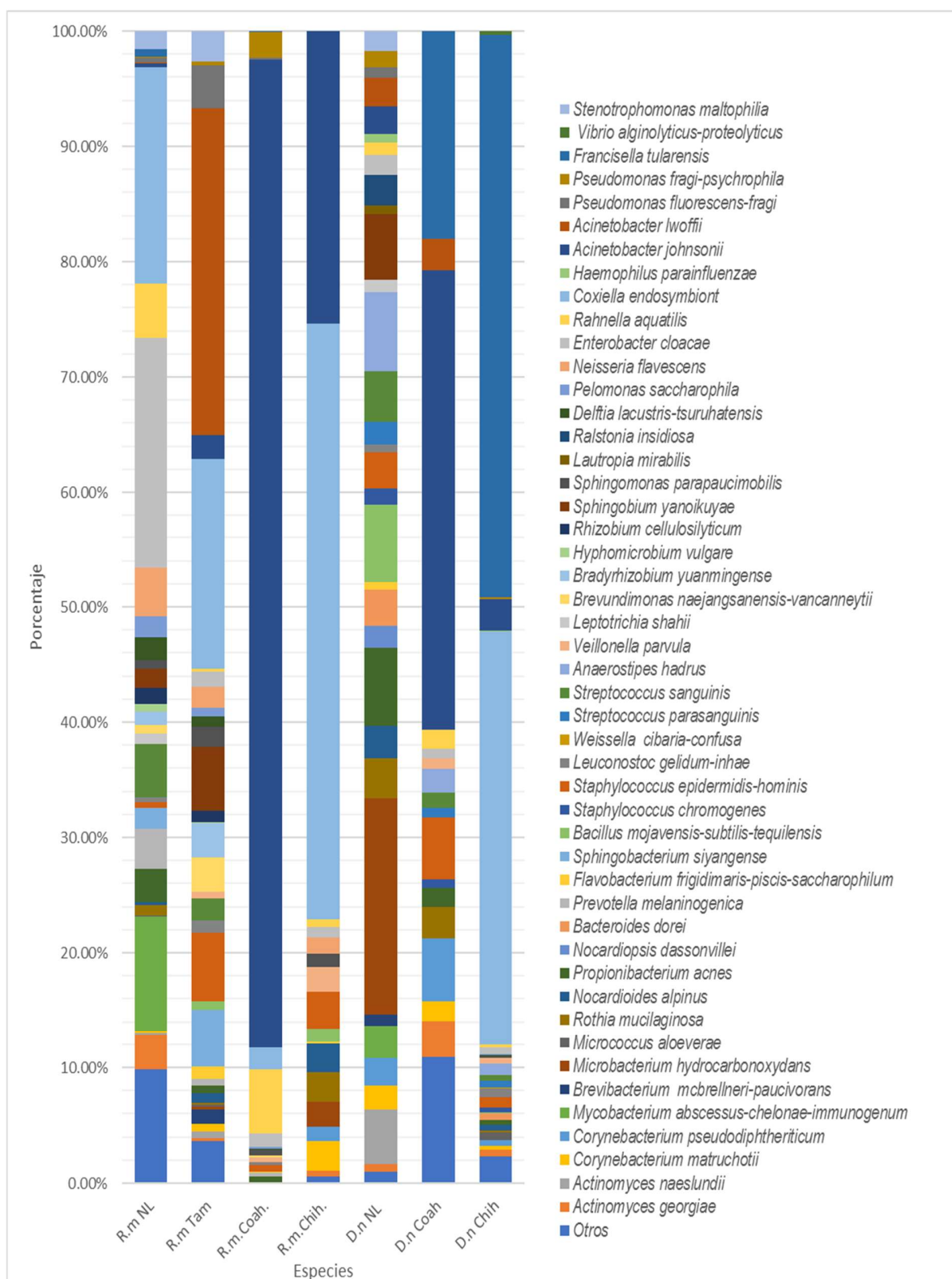
Índices de Shannon								
	Especie	Localidad				Sexo		
		N. L	Tamps	Coah	Chih	Hembras	Machos	
	<i>R. microplus</i>	2.717	2.612	2.603	0.6997	1.577	2.554	2.123
	<i>D. nitens</i>	2.739	3.086	--	1.902	1.369	1.954	2.868
	<i>A. cajennense</i>	1.32	--	--	--	--	--	--
	<i>A. maculatum</i>	2.752	--	--	--	--	--	--
	<i>O. megnini</i>	0.7253	--	--	--	--	--	--

**Tabla 15.** Análisis SIMPER entre especies de garrapatas colectadas en venado. Se muestra las 5 familias con el mayor porcentaje de contribución

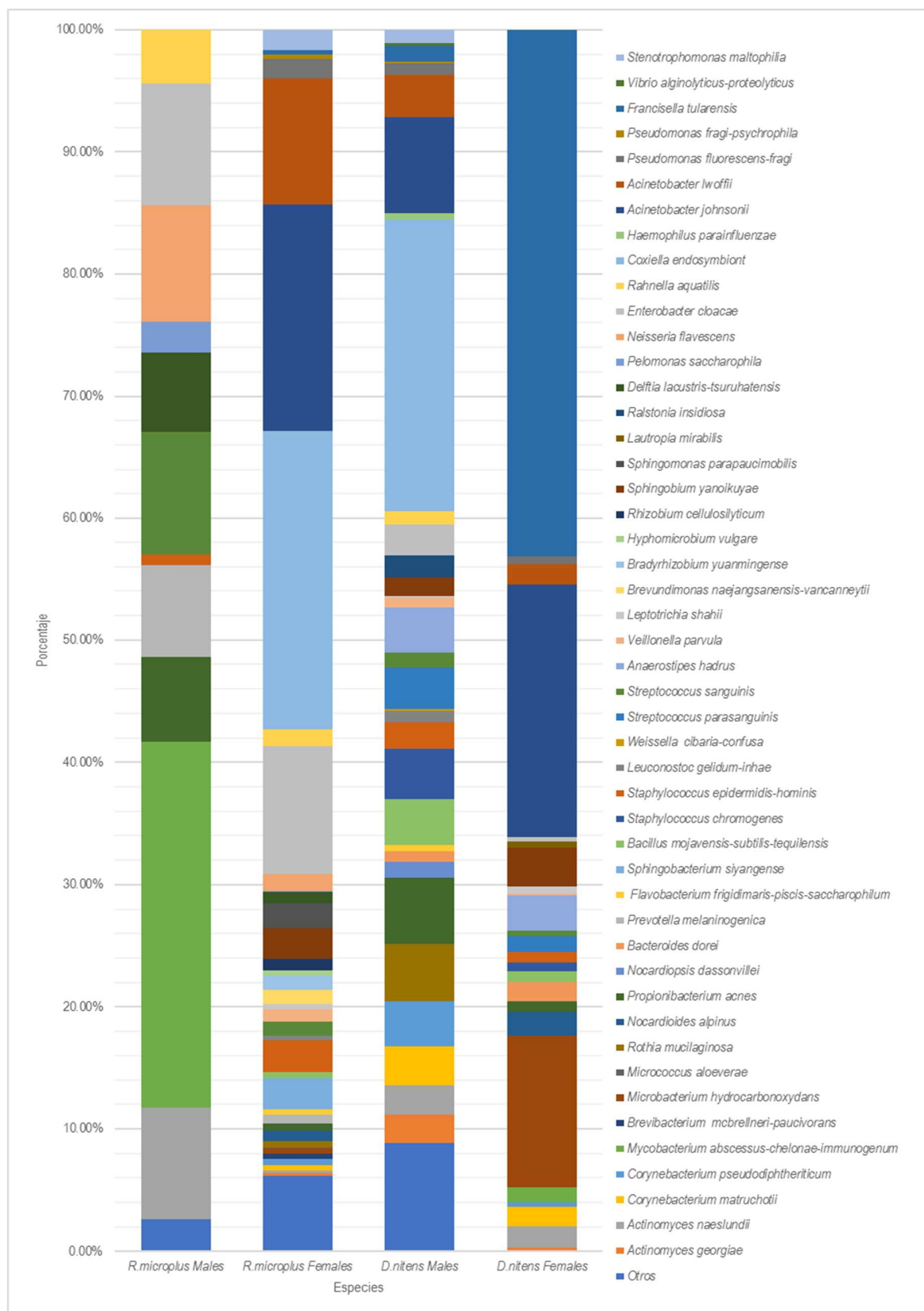
	Taxon (Familia)	Contrib. (%)	Taxon (Familia)	Contrib. (%)	Taxon (Familia)	Contrib. (%)	Taxon (Familia)	Contrib. (%)
	<i>R. microplus</i>		<i>A. maculatum</i>		<i>A. Cajennense</i>		<i>O. megnini</i>	
<i>D. nitens</i>	Avg dissimilarity: 49.89		Avg dissimilarity: 72.99		Avg dissimilarity: 56.66		Avg dissimilarity: 91.84	
	Francisellaceae	23.5	Midichloriaceae	46.55	Francisellaceae	21.06	Thiotrichales (NA)*	49.02
	Enterobacteriaceae	10.79	Francisellaceae	15.87	Moraxellaceae	14.73	Francisellaceae	12.37
	Coxiellaceae	9.615	Coxiellaceae	8.541	Coxiellaceae	11.33	Moraxellaceae	8.966
	Moraxellaceae	8.547	Microbacteriaceae	4.555	Microbacteriaceae	6.043	Coxiellaceae	6.745
	Microbacteriaceae	6.41	Corynebacteriaceae	3.416	Corynebacteriaceae	4.91	Microbacteriaceae	3.598
			Avg dissimilarity: 67.62		Avg dissimilarity: 52.45		Avg dissimilarity: 89.41	
			Midichloriaceae	50.5	Coxiellaceae	21.54	Thiotrichales (NA)*	50.61
			Coxiellaceae	16.22	Enterobacteriaceae	10.36	Moraxellaceae	13.9
			Enterobacteriaceae	5.792	Corynebacteriaceae	9.641	Coxiellaceae	12.19
			Moraxellaceae	4.865	Moraxellaceae	7.795	Enterobacteriaceae	5.717
			Mycobacteriaceae	3.32	Staphylococcaceae	6.359	Mycobacteriaceae	2.293
					Avg dissimilarity: 70.96		Avg dissimilarity: 92.86	
					Midichloriaceae	48.3	Thiotrichales (NA)*	47.52
					Moraxellaceae	10.27	Midichloriaceae	35.64
					Corynebacteriaceae	7.386	Moraxellaceae	9.619
					Staphylococcaceae	6.056	Enterobacteriaceae	1.281
					Streptococcaceae	4.579	Pseudomonadaceae	0.9537
							Avg dissimilarity: 90.36	
							Thiotrichales (NA)*	50.26
							Moraxellaceae	18.18
							Corynebacteriaceae	5.677
							Staphylococcaceae	4.438
							Streptococcaceae	3.66

\* Candidatus Endoeiteinascidia frumentis (64134)





**Figura 40.** Microbioma de *R. microplus* y *D. nitens*, de acuerdo con la localidad de colecta.



**Figura 41.** Microbioma de machos y hembras de *R. microplus* y *D. nitens* colectados.

## 6.6 Borrego cimarrón

En este hospedero solo se recolectaron garrapatas de la especie *D. hunteri*, y se comparó la composición del microbioma entre hembras y machos; el índice de Shannon de  $\alpha$ -diversidad por sexo fue 1,15 y 0,022 respectivamente, pero no hubo diferencia significativa entre ellas ( $p = 0,76$ ) (intervalo de confianza y otros índices se muestran en la tabla 17). Se observó que los phylum, clases y los órdenes taxonómicos más representativos en el microbioma en garrapatas hembra, están casi restringidos al phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria y a el orden Thiotrichales (100%, índice Chao 1 = 3); por su parte, el microbioma de los machos obtuvo una mayor diversidad (índice Chao 1 = 13), y está constituido principalmente por Proteobacteria, con 9 órdenes, de los cuales, el principal son las Gammaproteobacteria (84,6%); a este phylum le sigue los Firmicutes (2,5%) y las Actinobacteria (0,6%), todos los datos se resumen en la tabla 18.

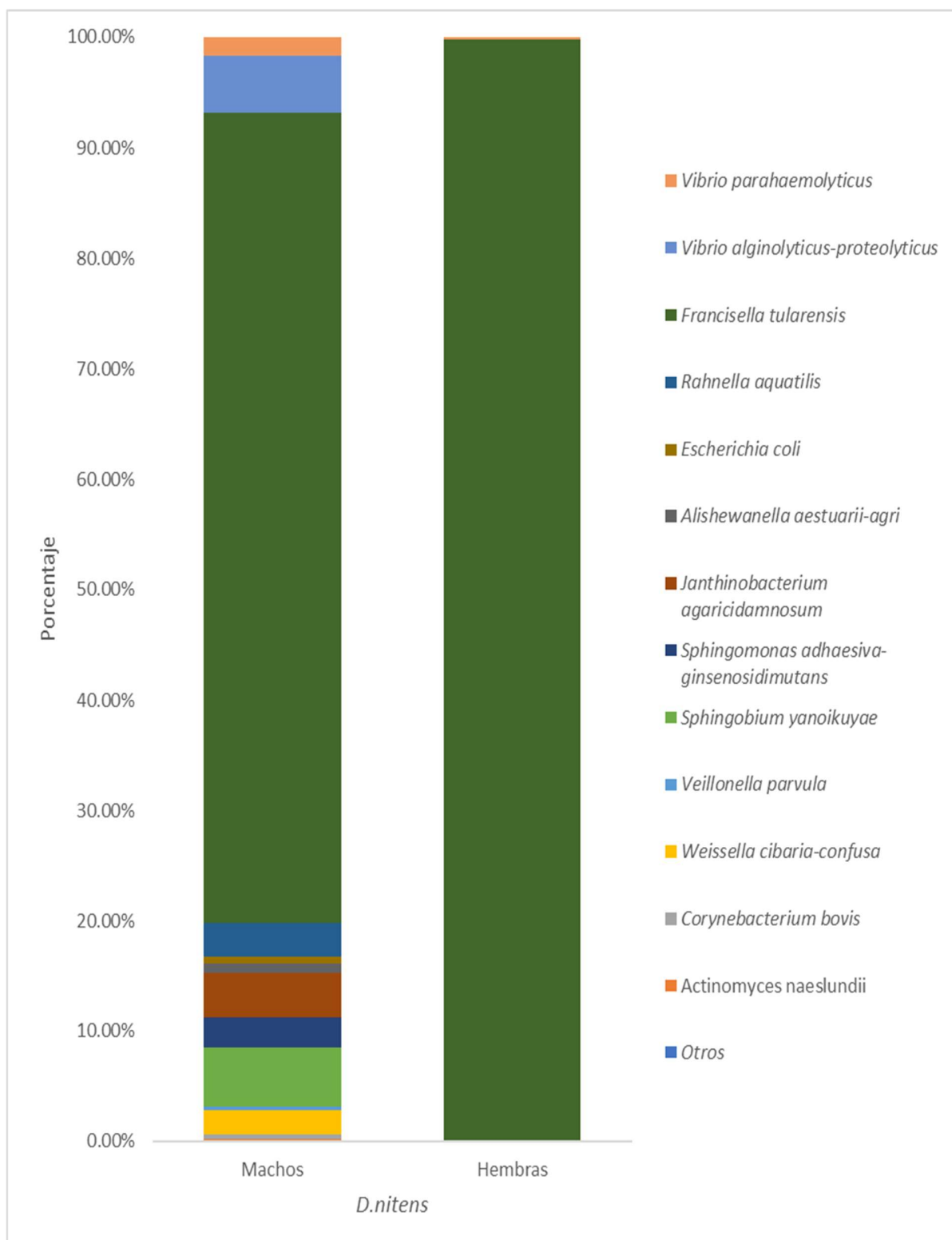
El microbioma en *D. hunteri* está constituido principalmente por Thiotrichales, específicamente por *Francisella tularensis*, la cual representó un 73.4% en machos y un 99.7% en hembras. Otras especies con un porcentaje significativo en el microbioma de los machos fueron *Sphingobium yanoikuyae* (5.3%), *Weissella cibaria* (2.2%), *Rahnella aquaticus* (3.0%), *Sphingomonas adhaesiva-ginsenosidimutans* (2.7%), *Janthinobacterium agaricidamnosum* (4.1%); y *Vibrio alginolyticus-proteolyticus* (5.1%). En el caso *Vibrio parahaemolyticus*, se identificó en ambos sexos y representó el 0,2% en hembras y 1,7% en machos (Fig 42). Las secuencias sin procesar se enviaron al archivo de lectura del NCBI con el número de acceso a la base de datos SRA SRR11692020 (Bioproject PRJNA630466 y BioSample SAMN14837982)

**Tabla 16.** Índices de alfa diversidad (intervalos de confianza) para hembras y machos de *D. hunteri*.

Ticks	Chao 1 index	Simpson index.	Shannon index
<i>D.hunteri</i> machos	13 (13-14)	0.45 (0.41-0.49)	1.15 (1.06-1.23)
<i>D.hunteri</i> hembras	3 (3-4)	0.0059 (0.0039-0.0139)	0.022 (0.016- 0.046)

**Tabla 17** Principales taxones identificados en el microbioma de *D. hunteri*.

Clasificación	Porcentaje (%)	
	Machos	Hembras
Actinobacteria	0.6	-
Actinobacteria	0.6	-
Actinomycetales	0.2	-
Corynebacteriales	0.4	-
Firmicutes	2.5	-
Bacilli	2.2	-
Lactobacillales	2.2	-
Negativicutes	0.3	-
Selenomonadales	0.3	-
Proteobacteria	96.9	100
Alphaproteobacteria	8.2	0.1
Rhizobiales	0.1	0.1
Sphingomonadales	8.1	-
Betaproteobacteria	4.1	-
Brukholderiales	4.1	-
Gammaproteobacteria	84.6	99.9
Alteromonadales	0.8	-
Enterobacteriales	3.7	-
Thiotrichales	73.3	99.8
Vibrionales	6.8	0.1



**Figura 42.** Composición del microbioma bacteriano de garrapatas *D. hunteri* machos y hembras

## 8. DISCUSION

En venado cola blanca se colectaron garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conocida como garrapata del ganado, en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila y Chihuahua, mismos que presentaron una infestación total de este ectoparásito del 29.47 %, del cual, el 87.14 % fueron hembras y 12.86 % machos, por lo que se observó una diferencia significativa entre sexos ( $P < 0.000$ ), y a pesar de que la prevalencia de este ectoparásito fue del 31 % en el norte de la república, en otros estados como Yucatán, dicha prevalencia llega al 97 % en *Cervus elaphus* (venado rojo), por lo que es un hospedero competente para esta especie, pues además de alimentarse del hospedero, la garrapata completa su ciclo de desarrollo ninfal (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2013) y al igual que el venado cola blanca, juega un papel importante como hospedero alternativo de este vector y de algunas de estas enfermedades (Busch *et al.*, 2014); durante su control, las garrapatas hembra junto con larvas se dispersan después del tratamiento, hacia hábitats favorables para su supervivencia a través de este hospedero, lo que facilita el recrudecimiento de las infestaciones en el ganado y en los mismos ungulados (Wang *et al.*, 2016). Los estados muestreados en este estudio se dedican a la producción ganadera, principalmente Nuevo León con 7.5 % y Sonora con 6 % de su economía (INEGI, 2015), por lo que a esta garrapata se le considera de suma importancia para este sector, debido a las grandes pérdidas económicas que produce a nivel mundial (Busch *et al.*, 2014) al ser vector biológico de patógenos causantes de babesiosis bovina (*Babesia bovis*, *B. bigemina*) y anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) y aunque el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) reconoció al estado de Sonora libre de garrapata *Boophilus spp*, en estados como Nuevo León y Tamaulipas siguen los esfuerzos para su erradicación (SENASICA, 2016; Wang *et al.*, 2016), debido a el manejo del venado cola blanca a través de diversos ranchos cinérgicos en el noreste de México, para poder percibir mejores ingresos con la caza del venado, las pieles y la carne para consumo humano; sin embargo los venados y el ganado en este tipo de ranchos, comparten las mismas áreas de alimentación (pastura), bebida y traslados, y por lo tanto también enfermedades asociadas a garrapatas (Cantú-Martínez *et al.*, 2008; Medrano *et al.*, 2012), aunque en el sur de Texas USA, existe un área de cuarentena de erradicación de garrapatas en el ganado, esto no se ha logrado, por movimientos ilegales y no regulados del ganado y la vida silvestre en México (Busch *et al.*, 2014). En lugares tropicales húmedos de México, la prevalencia de esta garrapata en borregos fue de 2.54 % (Coronel- Benedett *et al.*, 2017), sin embargo nosotros no localizamos a *Boophilus* en borrego cimarrón.

En Nuevo León, se colectó *D. nitens* 14.3 % que no había sido reportada para el venado cola blanca en dicho estado, Guzmán-Cornejo *et al.* (2016), la reportó para Tamaulipas, pero en diferentes hospederos como el ganado, caballos, perros, mulas, ovejas (no silvestres). La importancia de este ectoparásito es que las hembras de *D. nitens* transmiten *Babesia caballi* a su prole trasovariamente, y todos sus estadios son competentes para esta enfermedad, además de ser agente causal de piroplamosis en caballos (Schwint *et al.*, 2008).

En Sonora, se presentó la garrapata espinosa (*O. megnini*) en venado cola blanca 5.7 % y borrego cimarrón 0.53 %, el estado adulto no es parasítico (Nava *et al.*, 2009). A pesar de que su distribución se extiende desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de México y Suramérica, esta ninfa, no se les ha dado la misma importancia que a otras garrapatas ixodidas, *O. megnini*, puede tener múltiples ingestas sanguíneas y depositar lotes de huevos, lo que contrasta con la ovoposición única de muchas garrapatas (Walker *et al.*, 2014). Esta ninfa representa un peligro tanto para el ámbito veterinario como para el clínico, dado que presenta predilección por el canal auditivo, que puede resultar en una otoacariasis, con complicaciones de otitis externa, en el 90% de los casos existe dolor ótico, sin embargo, algunos casos pueden pasar asintomáticos, lo cual complica el grado de infestación, entre otros síntomas pueden estar la parálisis facial y/o respiratoria; puede afectar a las personas con un alto contacto con animales de ganado, ya sean vacas, mulas, cabras, conejos y borregos (Cakabay *et al.*, 2016). Este ectoparásito puede causar daño en el hospedero como: severas irritaciones, pérdida de peso y se menciona que hasta puede afectar el comportamiento de las crías (Niebuhr *et al.*, 2014); En general en los ungulados u otros hospederos, cuando una garrapata ninfa se alimenta causa pérdida de sangre lo que predispone a la atracción de otros insectos causándoles estrés en los hospederos (Almada-Resende *et al.*, 2012). Además actúan como vectores de rickettsias causantes de fiebre manchada y *Coxiella burnetii* (fiebre Q) (Diyas y Rajakaruna, 2016). Esta misma localidad presentó la mayor intensidad 10.2 y 25.5 de abundancia de garrapatas en borrego cimarrón, del total de garrapatas colectadas el 55% pertenecen a *D. hunteri* y en machos tuvo mayor proporción 41.6%. *Dermacentor parumapertus* es otra especie que se encuentra comúnmente en los desiertos de América del Norte, pero a diferencia de *D. hunteri* también se ha encontrado fuera de las áreas desérticas, lo que hace de este último un organismo único, ya que las garrapatas ixodide adaptadas al desierto son raras y restringidas principalmente al género *Hyalomma* en África del Norte y Medio Oriente (Furman y

Loomis, 1984); además esta garrapata se ha observado casi exclusivamente en borrego cimarrón, lo cual concuerda con otros autores y se tiene como nuevo registro en Baja California en ovejas salvajes (Crosbie *et al.*, 1997; Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016;). En California USA, poblaciones de este hospedero fueron seropositivas a *Anaplasma* spp (De la Fuente *et al.*, 2006); inclusive se considera como vector primario de *Anaplasma ovis* (Stiller *et al.*, 1999; Yabsley *et al.*, 2005) y otras *rikettsias*, lo que sugiere la importancia de este ectoparásito en la epidemiología de estas enfermedades (Yabsley *et al.*, 2005).

De acuerdo con la región corporal del hospedero, las garrapatas tuvieron cierta predilección para su alimentación en venado y borrego cimarrón, si solo se toma en cuenta el total de garrapatas adultas, se observó que las garrapatas tuvieron mayor predilección por las orejas 43.5 %, seguido de la cabeza 21.7 %, cuello 15.09 %, escapula 11.7 % y patas 8.26 %. En ciervos *Capreolus capreolus*, el 61 % de las garrapatas fueron colectadas en la cabeza (Vor *et al.*, 2010; Warwick *et al.*, 2016), obtuvieron un 32.02 % de garrapatas en ganado en la combinación con orejas y cabeza, en ovejas los mismos autores relacionaron la predilección alimenticia de las garrapatas con la abundancia y fue altamente correlacionados, observaron la predilección en cabeza que incluye las orejas 48.08 %. La preferencia de estos ectoparásitos por la cabeza y las orejas sobre la posición del hospedero se puede entender por grosor de la piel que es relativamente delgada y además es muy vascularizada en ambas regiones corporales (Bloemer *et al.*, 1988; L'Hostis *et al.*, 1994).

En borrego cimarrón, no hubo diferencia significativa ( $X^2 = 0.75$ , gl = 8,  $P > 0.05$ ) en la distribución espacial de las garrapatas, entre hembras y machos, las proporciones fueron muy similares para cada región corporal. En las orejas 30.60 % seguidas del cuello 20.76 % y lomo 20.21 %. Los resultados fueron similares en un estudio de regiones tropicales de México, la distribución de las garrapatas de la familia Ixodidae, en la infestación de las ovejas fue en cabeza y cuello con un 26.50 % (Coronel- Benedett *et al.*, 2017).

Se menciona que la densidad de garrapatas en los venados puede ser muy variable, y que esta depende según la época estacional en que se colecte y la edad de los ungulados (Vor *et al.*, 2010; Kiffner, Lödige, Alings, Vor, y Rühle, 2011). Nosotros solo colectamos en época de cacería otoño-invierno, y las garrapatas fueron adultas con excepción de *O. megnini*, que solo su estado parasítico es ninfal. En las garrapatas del género *Ixodes* y *Dermacentor* presentaron una preferencia hacia los ungulados más jóvenes, debido al comportamiento o hábitos del mismo, a su piel más delgada y vascularizada que en los adultos (Vor *et al.*, 2010), En los vendados corzos se observó que las



garrapatas adultas no tienen preferencia sobre el sexo del hospedero pero sí por su masa corporal (Kiffner *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, una de las principales estrategias para la erradicación de las garrapatas, es tener el conocimiento por su especificidad sobre el hospedero como en este caso para venados o de otras especies de ungulados, en el cual se podrían utilizar acaricidas, o dispersar ivermectinas específicas según el tipo de suelo o pastizal (Pound *et al.*, 2010), además se debe tomar en cuenta el ciclo de vida de las mismas, si las larvas o hembras están recién alimentadas, ya que esto podría variar la susceptibilidad al insecticida (Almada- Resende *et al.*, 2012).

También se estandarizaron protocolos de qPCR para el diagnóstico de patógenos transmitidos por garrapatas, como *E. chaffeensis*, *R. rickettsi*, *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, y *B. microti*; se realizó la cuantificación de los 5 patógenos en las muestras de garrapatas colectadas de venado cola blanca y borrego cimarrón, las cuales dieron por debajo de  $1 \times 10^7$  Nc/mL (Negativas), sin embargo estudios como el de Sosa-Gutiérrez *et al.* (2015) donde colectaron garrapatas de la vegetación y otros hospederos de distintos bosques y parques turísticos de la república, muestran una amplia distribución de dichos patógenos, por lo que sugieren la presencia de enfermedades endémicas no reconocidas y que es necesario determinar qué asociaciones entre el vector y los patógenos pueden dar lugar a la transmisión del agente, o representar un ciclo zoonótico silencioso. Así mismo en la secuenciación por Illumina no se hallaron los patógenos contemplados para el diagnóstico por qPCR, pero por secuenciación Illumina se observó en garrapatas del complejo *Amblyoma cajennense* la presencia de *Borrelia hermsii* (0.4%) que es un patógeno de borreliosis no Lyme responsable de causar fiebre recurrente transmitidas por garrapatas (TBRF) en humanos y animales en el oeste de los Estados Unidos, y genes alternativos que se limitan a especies TBRF como el de la proteína inmunogénica A de *Borrelia* (bipA) y glicerofosfodiéster fosfodiesterasa (glpQ), podrían ser más adecuados para su diagnóstico por PCR tiempo real (qPCR) (Modarelli *et al.*, 2019)

Por otro lado, al comparar microbiomas de garrapatas colectadas de venado cola blanca se observó que predominan los phylum Proteobacteria (71.12%), seguidas de Actinobacteria (10.76%), Firmicutes (10.39%) y Bacteroidetes (2.40%). Se observó como especies bacterianas predominantes a *Acinetobacter johnsonii* en *R. microplus* (15.9%), *D. nitens* (14.20%), *Amblyoma cajennense* (30.0%), *Amblyoma maculatum* (15.6%), Clayton *et al.* (2015) explican la presencia

del género *Acinetobacter* en las garrapatas es una disbiosis en el microbioma que resulta en una mayor colonización de este microorganismo, y sugiere que el microbioma puede tener un papel en la susceptibilidad a los contaminantes ambientales. Endosimbiontes del género *Coxiella* se observaron en las especies de *R. microplus* (21.0%) y *D. nitens* (12.0%), en esta última también se observó la especie *Francisella tularensis* (22.30%); esto es similar a lo observado por Narasimhan y Fikrig (2015). En el caso del género *Coxiella*, se han encontrado muchas otras especies asociadas con garrapatas y se consideran endosimbiontes, en *Amblyomma*, su presencia en las glándulas salivales altera la transmisión de *Ehrlichia chaffeensis* (Moutailler *et al.*, 2016), la especie *C. burnetii* se considera un patógeno importante de vertebrados, y podría ser una excepción dentro del género. También se han descrito endosimbiontes relacionados con *Francisella* que están asociados con *Dermacentor spp.*, pero su potencial patógeno aún se investiga (Vayssier-Taussat *et al.*, 2015). Dentro de las garrapatas del género *Amblyomma*, en las del complejo *A. maculatum* se observó una gran cantidad de endosimbiontes de la especie *Midichloria massilensis* (65.40%) no se identificaron patógenos, mientras que las garrapatas del complejo *A. cajennense*, no se observó presencia de estos endosimbiontes, y en esta especie se logró identificar a *Borrelia hermsii* (0.4%); Gofton *et al.* (2015) señalan que la abundancia de endosimbiontes como *Candidatus Midichloria mitochondrii*, limitan la eficacia NGS en artrópodos al enmascarar las bacterias menos abundantes, incluidos patógenos.

En el presente estudio también se observó que el microbioma en la mayoría de las hembras es menos diverso que en los machos, lo que significaría que la diversidad del microbioma se ve afectada por el sexo, en *R. microplus* se observó *A. johnsonii* (18.55%) y *Coxiella* endosimbionte (24.5%) solo en hembras; en *D. nitens*, estos mismos microorganismos se encontraron ambos sexos, con mayor porcentaje en hembras (20.63%), que en machos (7.83%), lo mismo para *Francisella tularensis* (hembras 43.2%, machos 1.33%). Esto se explica posiblemente debido a una mayor carga relativa de géneros como *Francisella* o *Coxiella*, podría tener un papel similar al reportado para *Rickettsia* (Ponnusamy *et al.*, 2014; Thapa *et al.*, 2019; Treuren *et al.*, 2015), estas bacterias son heredadas verticalmente (Travanty *et al.*, 2019), por transmisión transovárica (TOT) y su eficiencia puede estar relacionada con el grado de infección dentro de la garrapata, ya que las garrapatas "infectadas masivamente" dan lugar universalmente a una descendencia infectada e "infecciones leves" "que dan lugar a tasas variables de TOT (Telford III, 2009), lo cual es una

adaptación ventajosa para los microorganismos que utilizan este tipo de transmisión (Ponnusamy *et al.*, 2014).

En borrego cimarrón se colectaron únicamente garrapatas *Dermacentor hunteri* y este estudio reportó su microbioma, a través de secuenciación de última generación por primera vez, los resultados complementan el conocimiento del microbioma descrito para otras especies de *Dermacentor*, es decir, *D. andersoni*, *D. variabilis*, *D. occidentalis*, etc. (Greay *et al.*, 2018), al igual que en venado cola blanca se observó que la diversidad del microbioma se ve afectada por el sexo, y las garrapatas hembra tienen una diversidad menor, pero no fue significativa ( $p = 0.76$ ); otros estudios, que reportan 73% de prevalencia en machos y 100% en hembras garrapatas *Ixodes scapularis* recolectados en Texas (Thapa *et al.*, 2019).

En cuanto a las especies bacterianas, se observó una dominancia notable del filo Proteobacteria, con una prevalencia del 96,9% en machos y del 100% en hembras, dentro de este filo, se encontró que *F. tularensis* representa hasta el 99,7% de la diversidad del microbioma de *D. hunteri*; y aunque no hay estudios sobre esta asociación específica, la relación entre el género *Dermacentor* y *Fransicella* está bien documentada por Reif *et al.* (2018) quienes observaron que *F. novicida* tiene una mayor capacidad para ingresar y replicarse a niveles más altos en las células de *D. andersoni*. Por su parte, la asociación entre *F. tularensis* y *D. variabilis* sugiere que esta bacteria beneficia al vector adulto al disminuir su punto de congelación, lo que mejora su capacidad de hibernación (El Nabbout *et al.*, 2018), aunque se ha reportado que esta misma asociación disminuye la supervivencia en ninfas (Reese *et al.*, 2010) ya que curiosamente estos efectos negativos no se observaron en garrapatas adultas; Asimismo, el hallazgo continuo de vectores infectados en campo sugiere que, aunque *F. tularensis* afecta negativamente al estado físico de las garrapatas, existe un efecto compensatorio no identificado que mantiene la relación enzoótica vector-patógeno (Telford y Goethert, 2019).

Otras secuencias metagenómicas bacterianas reportadas en nuestros resultados fueron *Sphingomonas*, asociada con fuentes ambientales, se caracteriza por producir gomas en biopelículas y xenobióticos complejos biodegradables (Benson *et al.*, 2004), *Sphingomonas* también estuvo presente en *I. scapularis ovatus persulcatus*, *H. longicornis* y *H. flava*, comúnmente aisladas del suelo (Hernández-Jarguín *et al.*, 2018), y de *D. niveus ovatus* (Zhuang *et al.*, 2014). *Janthinobacterium agaricidamnorum* identificado en garrapatas macho, también es un conocido agente causante de la enfermedad de la pudrición blanda en *Agaricus bisporus*, el hongo cultivado

(Lincoln *et al.*, 1999), también se había informado en *Ixodes ricinus* (Petersen *et al.*, 2019). Se sabe que el género *Vibrio* exhibe endosimbiosis en *Amblyomma variegatum* e *Ixodes ricinus* dentro del grupo de géneros de bacterias / arqueas más prevalentes con 1.8% (Nakao *et al.*, 2013), y reportamos *Vibrio parahaemolyticus* con una prevalencia de 1.6%.

## 9. CONCLUSIÓN

Se logró estandarizar protocolos para el diagnóstico mediante qPCR de patógenos transmitidos por garrapatas, como *E. chaffeensis*, *R. rickettsi*, *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi*, y *B. microti*; y se realizó la cuantificación de los 5 patógenos en las muestras de garrapatas colectadas de venado cola blanca y borrego cimarrón, las cuales dieron  $< 0.0016\text{ng/ml}$ , es decir por debajo de  $1 \times 10^7$  Nc/mL.

Así mismo, se realizó la secuenciación de la región de DNA que codifica para 16s ribosomal, para la caracterización del microbioma de las garrapatas colectadas; en ambos hospederos el phylum predominante fue el de Proteobacterias, y las hembras de *R. micloplus* presentaron una mayor diversidad que los machos, mientras que en *D. nitens* y *D. hunteri* ocurrió lo contrario. Es importante la identificación de *Francisella tularensis*, su garrapata hospedera, y quizás su reservorio silvestre, y este estudio ha proporcionado la primera descripción general de la microbiota asociada con *D. hunteri* recolectada de borrego cimarrón, lo que sugirió una estrecha relación entre esta bacteria y su vector; aunque en México no se han reportado nuevos casos de esta enfermedad. en los últimos años, existen pocos estudios relacionados con la presencia de tularemia en hospedadores y vectores vertebrados, pero se necesita más investigación en el país para evaluar la presencia de ciclos zoonóticos, ya que *D. hunteri* podría ser capaz de transmitir tularemia en el área estudiada y poner en peligro la salud de la población local.

Para el género *Amblyomma* se observó colonización de *Acinetobacter*, y la presencia de *Borrelia hermsii* (0.4%) en garrapatas del complejo *A. cajennense*. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre las interacciones entre bacterias endosimbióticas y patógenas, ya que son una fuente importante para entender las enfermedades zoonóticas establecidas y emergentes, esto revelará nuevos conocimientos y modelos para controlar las enfermedades transmitidas por garrapatas, y permitirá la evaluación de riesgos a la salud humana.

## **10.PERSPECTIVAS**

De acuerdo con los resultados de este estudio se recomienda seguir con estudios de vigilancia epidemiológica enfermedades transmitidas por garrapatas en la población para conocer el riesgo de esta enfermedad en la población humana.

Por su papel como reservorios de garrapatas es posible continuar el muestreo de estas en fauna silvestre como lo son pequeños mamíferos como liebres, conejos, ratas de campo o ratones, lo que su vez permitirá la obtención de estadios ninfales y larvales de las especies reportadas o la identificación de otras especies de garrapatas que no están presentes en ungulados; y con la colecta de especies que no están sujetas a protección y temporada de caza, es posible también observar la distribución de las especies de garrapatas durante distintas temporadas del año; todo lo anterior conlleva a cambios en el microbioma de las garrapatas que pueden estudiarse al compararse entre estadios o a través del año.

En este trabajo se estudió el microbioma presente en el tracto digestivo de las garrapatas, pero es posible también realizar el estudio del microbioma de glándulas salivales y ovarios, lo que pudiera permitir el conocimiento del papel de estos en la transmisión de patógenos.

En el país no existen estudios de laboratorio que manipulen el microbioma de las garrapatas con el fin de establecer su función en la transmisión de patógenos específicos, al comparar el microbioma silvestre y el microbioma al que se le provocó disbiosis en el laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, K., Oteo, J.A., 2014. Aproximación clínica y principales rickettsiosis transmitidas por garrapatas presentes en Latinoamérica. *Rev. Chil. infectología* 31, 569–576. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500009>
- Abraham, N.M., Liu, L., Jutras, B.L., Yadav, A.K., Narasimhan, S., Gopalakrishnan, V., Ansari, J.M., Jefferson, K.K., Cava, F., Jacobs-Wagner, C., Fikrig, E., 2017. Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201613422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613422114>
- Alekseev, A.N., Semenov, A. V, 2003. Evidence of *Babesia microti* infection in multi-infected *Ixodes persulcatus* ticks in Russia. *Exp. Appl. Acarol.* 29, 345–353.
- Almada Resende, J.D. de sousa, Daemon, E., De Olivera Montero, C.M., Maturano, R., Prata, D.A., Ferreira Rodrigues, A.F.S., 2012. Experimental Parasitology Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* ( Fabricius , 1787 ) ( Acari : Ixodidae ) and *Dermacentor nitens* ( Neumann , 1897 ) ( Acari : Ixodidae ) larvae. *Exp. Parasitol.* 131, 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.002>
- Altay, K., Dumanli, N., Aktaş, M., Özübek, S., 2014. Survey of *Anaplasma* Infections in Small Ruminants from East Part of Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 20, 1–4. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.9189>
- Amerasinghe, F., Breisch, N., Azad, A., 1992. Distribution, density, and Lyme disease spirochete infection in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) on white-tailed deer in Maryland. *J. Med. Entomol.* 29(1), 54–61.
- Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2015. Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 33, 395–401. <https://doi.org/10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus>
- Baneth, G., 2014. Tick-borne infections of animals and humans: A common ground. *Int. J. Parasitol.* 44, 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.011>
- Benson, M.J., Gawronski, J.D., Eveleigh, D.E., Benson, D.R., 2004. Intracellular symbionts

- and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl Env. Microbiol* 70, 616–620.
- Bernabeu-Wittel, M., Segura-Porta, F., 2005. Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23, 313–320.
- Bloemer, S.R., Zimmerman, R.H., Fairbanks, K., 1988. Abundance, attachment sites, and density estimators of lone star ticks (*Acari: Ixodidae*) infesting white-tailed deer. *J. Med. Entomol.* 25, 295–300. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.4.295>
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M., Duron, O., 2017. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00236>
- Buchalski, M.R., Navarro, A.Y., Boyce, W.M., Vickers, T.W., Tobler, M.W., Nordstrom, L.A., Alaníz, J., Gille, D.A., Cecilia, M., Penedo, T., Ryder, O.A., Ernest, H.B., 2015. Genetic population structure of Peninsular bighorn sheep ( *Ovis canadensis nelsoni* ) indicates substantial gene flow across US – Mexico border. *Biol. Conserv.* 184, 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.006>
- Busch, J.D., Stone, N.E., Nottingham, R., Araya-Anchetta, A., Lewis, J., Hochhalter, C., Giles, J.R., Gruendike, J., Freeman, J., Buckmeier, G., Bodine, D., Duhaime, R., Miller, R.J., Davey, R.B., Olafson, P.U., Scoles, G.A., Wagner, D.M., 2014. Widespread movement of invasive cattle fever ticks (*Rhipicephalus microplus*) in southern Texas leads to shared local infestations on cattle and deer. *Parasit. Vectors* 7, 188. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-188>
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Cabezas-Cruz, A., Vayssier-Taussat, M., Greub, G., 2018. Tick-borne pathogen detection: what's new? *Microbes Infect.* 20, 441–444.



<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.12.015>

- Cakabay, T., Gokdogan, O., Kocyigit, M., 2016. Human otoacariasis : Demographic and clinical outcomes in patients with ear-canal ticks and a review of literature. *J. Otol.* 11, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2016.06.003>
- Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869.DADA2>
- Cantú-Martínez, M., Salinas-Meléndez, J.A., Zarate-Ramos, J., Ávalos-Ramírez, R., Martínez-Muñoz, A., Segura-Correa, J., 2008. Prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *B. bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) in farms of northeastern Mexico. *J. Anim. Vet. Adv.* 7, 121–123.
- Carrillo-Bonilla, L.M., Betancur- Cardona, S., Roldán- Cardona, D., Pérez- Jaramillo, J.E., Galeano-Rivera, D., Loaiza-Echeverri, É.T., Giraldo-Echeverri, C.A., 2014. Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de *Ehrlichia* spp., en caninos de Medellín (Colombia). *CES Med. Vet. y Zootec.* 7, 38–46.
- CDC, 2018. Babesiosis - Biology [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/biology.html> (accessed 1.19.21).
- Celli, J., Zahrt, T.C., 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010314>
- Chávez, A.S.O., Shaw, D.K., Munderloh, U.G., Pedra, J.H.F., 2017. Tick humoral responses: Marching to the beat of a different drummer. *Front. Microbiol.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00223>
- Chen, Z., Liu, Q., Liu, J.-Q., Xu, B.-L., Lv, S., Xia, S., Zhou, X.-N., 2014. Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasit. Vectors* 7, 237. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-237>
- Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, A.-C., de Cat, A., Madder,

- M., Saegerman, C., Heyman, P., Lempereur, L., 2013. Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasites and Vectors* 6, 183. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-183>
- Clay, K., Ph, D., Fuqua, C., Ph, D., 2010. The tick microbiome: diversity , distribution and influence of the internal microbial community for a blood - feeding disease vector, in: *Critical Needs and Gaps in Understanding Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes*. pp. 1–12.
- Clayton, K.A., Gall, C.A., Mason, K.L., Scoles, G.A., Brayton, K.A., 2015. The characterization and manipulation of the bacterial microbiome of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Parasites and Vectors* 8, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1245-z>
- Coronel- Benedett, K.C., Ojeda- Robertos, N.F., Gonzalez- Garduño, R., Martinez- Ibañez, F., Rodriguez- Vivas, R.I., 2017. Prevalence , intensity and population dynamics of hard ticks ( Acari : Ixodidae ) on sheep in the humid tropics of Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0195-x>
- Corporation., L.T., 2012. Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays.
- Coumou, J., Poll, T. van der, Speelman, P., Hovius, J.W., 2011. Tired of Lyme borreliosis: Lyme borreliosis in the Netherlands. *Neth. J. Med.* 63, 101–108.
- Crosbie, P., Goff, W., Stiller, D., Jessup, D., 1997. The distribution of *Dermacentor hunteri* and *Anaplasma* sp. in desert bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *J. Parasitol.* 31–37.
- Dantas-Torres, F., Camara Alves, L., Uilenberg, G., 2017. Babesiosis, in: *Arthropod Borne Diseases*. pp. 347–354. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2017. Anaplasmosis, in: *Arthropod Borne Diseases*. pp. 605–621. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013. Species diversity and abundance of ticks in three

habitats in southern Italy. Ticks Tick. Borne. Dis. 4, 251–255.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.11.004>

De la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A.G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K.M., Mansfield, K.L., Nijhof, A.M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Caracappa, S., Fooks, A.R., Gortazar, C., Rego, R.O.M., 2017. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>

De la Fuente, J., Atkinson, M.W., Hogg, J.T., Miller, D.S., Naranjo, V., Almazán, C., Anderson, N., Kocan, K.M., 2006. Genetic characterization of *Anaplasma ovis* strains from bighorn sheep in Montana. J. Wildl. Dis. 42, 381–385.  
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.381>

De la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., Kocan, K.M., 2015. *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. Trends Microbiol. 20.

De la Fuente, J., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., Saliki, J.T., Kocan, K.M., 2002. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 658–68. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.658>

De la Fuente, J., Villar, M., Cabezas-Cruz, A., Estrada-Peña, A., Ayllón, N., Alberdi, P., 2016. Tick–Host–Pathogen Interactions: Conflict and Cooperation. PLoS Pathog. 12, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005488>

Dices.net, 1998a Mapa de Rancho El Aígame, Sonora, La Colorada en México - imagen de satélite / imagen satelital, coordenadas GPS <https://www.dices.net/america/mexico/movil/mapa.php?nombre=Rancho-El-Aigame&id=1517>(accessed 4.4.20)

- Dices.net, 1998b. Mapa de El Plomito, Sonora, Pitiquito en México - imagen de satélite / satelital, coordenadas GPS [WWW Document]. Dir. Cartogr. España y América. URL <https://www.dices.net/mapas/mexico/mapa.php?nombre=El-Plomito&id=21638> (accessed 4.4.20).
- Diuk-Wasser, M.A., Vannier, E., Krause, P.J., 2016. Coinfection by Ixodes Tick-Borne Pathogens: Ecological, Epidemiological, and Clinical Consequences. *Trends Parasitol.* 32, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.008>
- Diyes, G.C.P., Rajakaruna, R.S., 2016. Seasonal dynamics of spinose ear tick *Otobius megnini* associated with horse otoacariasis in Sri Lanka. *Acta Trop.* 159, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.025>
- Dobson, A.D.M., Auld, S.K.J.R., 2016. Epidemiological Implications of Host Biodiversity and Vector Biology: Key Insights from Simple Models. *Am. Nat.* 187, 405–422. <https://doi.org/10.1086/685445>
- Duttmann, C., Flores, B., Kadoch Z, N., Bermudez C, S., 2016. Hard ticks (Acari: Ixodidae) of livestock in Nicaragua, with notes about distribution. *Exp. Appl. Acarol.* 70, 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0059-9>
- Edwards, K.T., Goddard, J., Varela-Stokes, A.S., 2009. Examination of the internal morphology of the ixodid tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” pictorial dissection guide. *Midsouth Entomol.* 2, 28–39.
- El Nabbout, A., Taylor, B.J., Kho, J., Mitton, M., Rossolimo, T., 2018. The Correlation of *Francisella tularensis* on Size and Supercooling of *Dermacentor variabilis*. *Int. J. Biol.* 10, 15. <https://doi.org/10.5539/ijb.v10n2p15>
- Escudero-Nieto, R., Guerrero-Espejo, A., 2005. Enfermedades producidas por *Borrelia*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23, 232–240.
- Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., Obregón, D., 2020. Behind taxonomic variability: The functional redundancy in the tick microbiome. *Microorganisms* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111829>

- Furman, D.P., Loomis, E.C., 1984. Ticks of California (Acari:Ixodida), Bulletin of the California Insect Survey.
- Galaviz-Silva, L., Pérez-Treviño, K.C., Molina-Garza, Z.J., 2013. Distribution of ixodid ticks on dogs in Nuevo León, Mexico, and their association with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Exp. Appl. Acarol.* 61, 491–501.
- García-Meléndez, M., Taylor, C.S.C., Salas-Alanís, J., Meléndez, M., Taylor, C.S.C., 2014. Enfermedad de Lyme : actualizaciones. *Gac. médica* ... 150, 84–95.
- Gaumond, G., Tyropolis, A., Grodzicki, S., Bushmich, S., 2006. Comparison of direct fluorescent antibody staining and real-time polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 586, 583–586.
- Ginsberg, H.S., 2008. Potential effects of mixed infections in ticks on transmission dynamics of pathogens: comparative analysis of published records. *Exp. Appl. Acarol.* 46, 29–41. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9695-2>
- Gofton, A.W., Oskam, C.L., Lo, N., Beninati, T., Wei, H., McCarl, V., Murray, D.C., Papparini, A., Greay, T.L., Holmes, A.J., Bunce, M., Ryan, U., Irwin, P., 2015. Inhibition of the endosymbiont “*Candidatus Midichloria mitochondrii*” during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. *Parasites and Vectors* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0958-3>
- Greay, T.L., Gofton, A.W., Papparini, A., Ryan, U.M., Oskam, C.L., Irwin, P.J., 2018. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites and Vectors* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2550-5>
- Guzmán-Cornejo, C., Robbins, R.G., Guglielmone, A.A., Montiel-Parra, G., Pérez, T.M., 2011. The Amblyomma (Acari: Ixodida: Ixodidae) of Mexico: Identification Keys, distribution and hosts. *Zootaxa* 16–38.
- Guzmán-Cornejo, C., Robbins, R.G., Guglielmone, A.A., Montiel-Parra, G., Rivas, G., Pérez, T.M., 2016. The Dermacentor (Acari, Ixodida, ixodidae) of Mexico: Hosts,

- geographical distribution and new records. *Zookeys* 2016, 1–22. <https://doi.org/10.3897/zookeys.569.7221>
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., Kopáček, P., 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026>
- Harik, N.S., 2013. Tularemia: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Pediatr. Ann.* 42, 288–292. <https://doi.org/10.3928/00904481-20130619-13>
- Hernández-Jarguín, A., Díaz-Sánchez, S., Villar, M., de la Fuente, J., 2018. Integrated metatranscriptomics and metaproteomics for the characterization of bacterial microbiota in unfed *Ixodes ricinus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1241–1251. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.020>
- Herrera -Lorenzo, O., Infante-Ferrer, J., Ramírez-Reyes, C., 2011. Enfermedad de Lyme : Historia , Microbiología , Epizootiología y Epidemiología. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 50, 231–244.
- Hightower, J., Kracalik, I.T., Vydayko, N., Goodin, D., Glass, G., Blackburn, J.K., 2014. Historical distribution and host-vector diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, in Ukraine. *Parasit. Vectors* 7, 453. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0453-2>
- Hilal, T., Snapp, W.K., 2015. The Perils of Country Life: Human Monocytic Ehrlichiosis. *Am. J. Med.* 128, 831–833. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.04.003>
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Hoskins, J.D., 1991. Ixodid and Argasid Ticks. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21, 185–197. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50018-8](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50018-8)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015a. . [WWW Document]. URL <http://www.inegi.org.mx/> (accessed 10.11.17).

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015b. Cuentame [WWW Document]. URL [http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/son/territorio/div\\_municipal.aspx?tema=me&e=26](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/son/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=26) (accessed 10.12.17).
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2010. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México [WWW Document]. URL <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/> (accessed 10.10.17).
- Jones, C.R., Brunner, J.L., Scoles, G.A., Owen, J.P., 2015. Factors affecting larval tick feeding success: Host, density and time. *Parasites and Vectors* 8, 15–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0955-6>
- Karami, A., 2012. Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi* 1–27.
- Kazimírová, M., Štibrániová, I., 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043>
- Keirans, J.E., Litwak, T.R., 1989. Pictorial key to the adults of hard ticks, family Ixodidae (Ixodida: Ixodoidea), east of the Mississippi River. *J. Med. Entomol.* 26, 435–448.
- Kiffner, C., Lödige, C., Alings, M., Vor, T., Rühle, F., 2011. Body-mass or sex-biased tick parasitism in roe deer (*Capreolus capreolus*)? A GAMLSS approach. *Med. Vet. Entomol.* 25, 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00929.x>
- Koneman, E., Allen, S., 2008. Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Texto Y Atlas En Color*, 6ta ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Krause, P.J., McKay, K., Thompson, C.A., Sikand, V.K., Lentz, R., Lepore, T., Closter, L., Christianson, D., Telford, S.R., Persing, D., Radolf, J.D., Spielman, A., 2002. Disease-Specific Diagnosis of Coinfecting Tickborne Zoonoses: Babesiosis, Human Granulocytic Ehrlichiosis, and Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1184–1191. <https://doi.org/10.1086/339813>
- Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R., Weigl, E., 2007.

- Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub. 151, 175–186.
- Kubelkova, K., Macela, A., 2015. Putting the Jigsaw Together - A Brief Insight into the Tularemia. Open Life Sci. 10, 117–138. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0013>
- Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J.I., Margos, G., Fish, D., Ogden, N.H., 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. Nat. Rev. Microbiol. 4, 660–669. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1475>
- L'Hostis, M., Diarra, O., Seegers, H., 1994. Sites of attachment and density assessment of female *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on dairy cows. Exp. Appl. Acarol. 18, 681–689. <https://doi.org/10.1007/BF00051535>
- Lado, P., Nava, S., Mendoza-Uribe, L., Caceres, A.G., Delgado-De La Mora, J., Licon-Enriquez, J.D., Delgado-De La Mora, D., Labruna, M.B., Durden, L.A., Allerdice, M.E.J., Paddock, C.D., Szabó, M.P.J., Venzal, J.M., Guglielmone, A.A., Beati, L., 2018. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) group of ticks: Phenotypic plasticity or incipient speciation? 06 Biological Sciences 0604 Genetics. Parasites and Vectors 11, 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3186-9>
- Leal-Balbino, T.C., Melo de Oliveira, M.B., Silva de Barros, M.P., Sobreira, M., da Mota Silveira-Filho, V., 2017. Plague and Tularemia, in: Arthropod Borne Diseases. pp. 155–169. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>
- León-Artozqui, M., 2012a. Garrapatas ( Ixodidae ) I: Anatomía , biología y ecología. ConsultDifusVet 185, 25–30.
- León-Artozqui, M., 2012b. Garrapatas ( Ixodidae ) II : papel patógeno Una seria amenaza para las personas y los animales. ConsultDifusVet 186, 29–35.
- Lincoln, S.P., Fermor, T.R., Tindall, B.J., 1999. A soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1577–1589.



- Little, S., 2017. Ehrlichiosis, in: Arthropod Borne Diseases. pp. 205–212.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8>
- Lucero-Velasco, E.A., Molina-Garza, Z.J., Galaviz-Silva, L., 2018. First survey of cultivable bacteria from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and assessment of the antagonism against five microorganisms of clinical importance assessment of the antagonism against five microorganisms of clinical importance. *Int. J. Acarol.* 44, 204–209.  
<https://doi.org/10.1080/01647954.2018.1495262>
- Márquez-Jiménez, F.J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Jesús Rodríguez-Liébana, J., Ángel Muniain-Ezcurra, M., 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23, 94–102.
- Martinez, A., Salinas, A., Martinez, F., Cantu, A., Miller, D.K., 1999. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. *J. Wildl. Dis.* 35, 799–803.
- Medrano, C., Boadella, M., Barrios, H., Cantú, A., García, Z., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2012. Zoonotic pathogens among white-tailed deer, northern Mexico, 2004-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1372–1374.
- Miranda, J., Mattar, S., Perdomo, K., Palencia, L., 2009. Seroprevalencia de Borreliosis, o Enfermedad de Lyme, en una Población Rural Expuesta de Córdoba, Colombia. *Rev. Salud Pública* 11, 480–489.
- Modarelli, J.J., Piccione, J., Ferro, P.J., Esteve-Gasent, M.D., 2019. Novel real-time PCR assays for genomic group identification of tick-borne relapsing fever species *Borrelia hermsii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 93, 24–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.001>
- Molina-Garza, Z.J., Galaviz-Silva, L., 2019. Cultivable bacteria isolated from cattle ticks of Nuevo León and Zacatecas, Mexico, and an assessment of their antagonism against bacteria of clinical concern. *Int. J. Acarol.* 00, 1–7.  
<https://doi.org/10.1080/01647954.2019.1696405>

- Mooring, M.S., Hart, B.L., Fitzpatrick, T.A., Reisig, D.D., Nishihira, T.T., Fraser, I.C., Benjamin, J.E., 2006. Grooming in desert bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) and the ghost of parasites past. *Behav. Ecol.* 17, 364–371. <https://doi.org/10.1093/beheco/arj039>
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Vourc'h, G., Vayssier-Taussat, M., 2016. Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>
- Nakao, R., Abe, T., Nijhof, A.M., Yamamoto, S., Jongejan, F., Ikemura, T., Sugimoto, C., 2013. A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *ISME J.* 7, 1003–1015. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.171>
- Narasimhan, S., Fikrig, E., 2015. Tick microbiome : the force within. *Trends Parasitol.* 31, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010>
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., Eppler-Epstein, R., Deponte, K., Fish, D., Fikrig, E., 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe* 15, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.001>
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 252–276. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
- Nava, S., Mangold, J., Guglielmone, A. A., 2009. Field and laboratory studies in a Neotropical population of the spinose ear tick , *Otobius megnini*. *Med. Vet. Entomol.* 23, 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00761.x>

- Niebuhr, C.N., Mays, S.E., Breeden, J.B., Lambert, B.D., Kattes, D.H., 2014. Efficacy of chemical repellents against *Otobius megnini* ( Acari : Argasidae ) and three species of ixodid ticks. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9799-6>
- O.V.I.S., 2011. PROGRAMAS [WWW Document]. Organ. Vida Silv. URL <http://ovis.org.mx/programas/> (accessed 10.11.17).
- Obregón, D., Rabelo, M.D., Giglioti, R., Bihassi, T.B., Neo, T.A., Corona, B., Pastor, A., Machado, R.Z., Olivera, M., 2016. Standardization of a SYBR Green Based Real-Time PCR System for Detection and Molecular Quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). J. Buffalo Sci. 5, 44–52. <https://doi.org/10.6000/1927-520x.2016.05.02.4>
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, n.d. Nuevo Laredo, Tamaulipas | OCDE Mexico [WWW Document]. Ciudad. y Dir. URL <http://www.ocdemexico.org.mx/Tamaulipas/Nuevo-Laredo/> (accessed 10.9.18).
- Ostfeld, R.S., Keesing, F., 2012. Effects of Host Diversity on Infectious Disease. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 43, 157–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145022>
- Paddock, C.D., Childs, J.E., 2003. Ehrlichia chaffeensis: a Prototypical Emerging Pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 16, 37–64. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.37>
- Paddock, C.D., Yabsley, M.J., 2007. Ecological Havoc , the Rise of White-Tailed Deer , and the Emergence of Amblyomma americanum -Associated Zoonoses in the United States, in: Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission. pp. 289–324.
- Pagano, R., 1999. Estadística para las ciencias del comportamiento.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. Clin. Microbiol. Rev. 26, 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>

- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897–928.
- Peniche-Lara, G., Perez-Osorio, C., Dzúl-Rosado, K., Zavala-Castro, J., 2015. Artículo de Revisión Rickettsiosis : Enfermedad Re-Emergente en México. *Cienc. y Humanismo en la Salud* 2, 76–84.
- Pérez, T.M., Guzmán-cornejo, C., Montiel-parra, G., Gerardo, R.P., 2014. Biodiversidad de ácaros en México Biodiversity of Acari in Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 399–407.
- Petersen, A., Rosenstjerne, M.W., Rasmussen, M., Fuursted, K., Nielsen, H.V., O’Brien Andersen, L., Bødker, R., Fomsgaard, A., 2019. Field samplings of *Ixodes ricinus* ticks from a tick-borne encephalitis virus micro-focus in Northern Zealand, Denmark. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 1028–1032. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.005>
- Ponnusamy, L., Gonzalez, A., Van Treuren, W., Weiss, S., Parobek, C.M., Juliano, J.J., Knight, R., Roe, R.M., Apperson, C.S., Meshnick, S.R., 2014. Diversity of rickettsiales in the microbiome of the lone star tick, *amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 354–359. <https://doi.org/10.1128/AEM.02987-13>
- Portillo, A., Santibañez, S., Oteo, J.A., 2014. Enfermedad de Lyme. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 32, 37–42.
- Pound, J.M., George, J.E., Kammlah, D.M., Lohmeyer, K.H., Davey, R.B., 2010. Evidence for Role of White-Tailed Deer (*Artiodactyla: Cervidae*) in Epizootiology of Cattle Ticks and Southern Cattle Ticks (*Acari: Ixodidae*) in Reinfestations Along the Texas/Mexico Border in South Texas: A Review and Update. *J. Econ. Entomol.* 103, 211–218. <https://doi.org/10.1603/EC09359>
- Pruneau, L., Moumène, A., Meyer, D.F., Marcelino, I., Lefrançois, T., Vachiéry, N., 2014. Understanding Anaplasmataceae pathogenesis using “Omics” approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00086>
- Quarsten, H., Skarpaas, T., Fajs, L., Noraas, S., Kjelland, V., 2015. Tick-borne bacteria in *Ixodes ricinus* collected in southern Norway evaluated by a commercial kit and

established real-time PCR protocols. Ticks Tick. Borne. Dis.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.008>

Reese, S.M., Dietrich, G., Dolan, M.C., Sheldon, S.W., Piesman, J., Petersen, J.M., Eisen, R.J., 2010. Transmission dynamics of *Francisella tularensis* subspecies and clades by nymphal *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 645–652. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0127>

Reif, K.E., Ujcz, J.K., Alperin, D.C., Noh, S.M., 2018. infection competence differs in cell lines derived from United States populations of *Dermacentor andersoni* and *Ixodes scapularis*. *Sci. Rep.* 2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30419-4>

Renneker, S., Abdo, J., Salih, D.E.A., Karagenç, T., Bilgiç, H., Torina, A., Oliva, A.G., Campos, J., Kullmann, B., Ahmed, J., Seitzer, U., 2013. Can *Anaplasma ovis* in Small Ruminants be Neglected any Longer? *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 105–112. <https://doi.org/10.1111/tbed.12149>

Rodríguez- González, I., 2013. Actualización acerca de *Borrelia burgdorferi* sensu lato y enfermedad de Lyme Update on *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Lyme disease. *Rev. Cubana Med. Trop.* 65, 149–165.

Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda- Chi, M.M., Rosado-Aguilar, J.A., Trinidad-Martínez, I.C., Torres-Acosta, J.F.J., Ticante-Perez, V., Castro-Marín, J.M., Tapia-Moo, C.A., Vázquez-Gómez, G., Ojeda-Chi, M.M., Rosado-Aguilar, J.A., Trinidad-Martínez, I.C., Torres-Acosta, J.F.J., Ticante-Perez, V., Castro-Marín, J.M., Tapia-Moo, C.A., Vázquez-Gómez, G., 2013. Red deer (*Cervus elaphus*) as a host for the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 60, 543–552. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9672-z>

Rodríguez, S.D., García Ortiz, M.Á., Jiménez Ocampo, R., Vega y Murguía, C.A., 2009. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect. Genet. Evol.* 9, 1092–1101. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.007>

Ross, D.E., Levin, M.L., 2004. Effects of *Anaplasma phagocytophilum* Infection on the

- Molting Success of *Ixodes scapularis* ( Acari : Ixodidae ) Larvae. J. Med. Entomol. 41, 476–483.
- Saito, T.B., Thirumalapura, N.R., Shelite, T.R., Rockx-Brouwer, D., Popov, V.L., Walker, D.H., 2015. An animal model of a newly emerging human ehrlichiosis. J. Infect. Dis. 211, 452–461. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu372>
- Salinas-Meléndez, J.A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., Fimbres-Durazo, H., 2002. Serologic survey in animals of “Q” fever in Nuevo Leon. Rev. Latinoam. Microbiol. 44, 75–78.
- Schroeder, C., Chowdhury, I., Narra, H., Patel, J., Sahni, A., Sahni, S., 2016. Rickettsiales. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46859-4>
- Schwint, O.N., Knowles, D.P., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S., Scoles, G. a, 2008. Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) is restricted to one generation in the absence of alimentary reinfection on a susceptible equine host. J. Med. Entomol. 45, 1152–1155. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[1152:TOBCBD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[1152:TOBCBD]2.0.CO;2)
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 12.
- SENASICA, 2016. Situación actual del control de la garrapata *boophilus* spp. [WWW Document]. Serv. Nac. Sanid. Inocuidad y Calid. Agroaliment. URL <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp> (accessed 10.12.17).
- Shaw, M.T., Keesing, F., McGrail, R., Ostfeld, R.S., 2003. Factors influencing the distribution of larval blacklegged ticks on rodent hosts. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68, 447–452.
- Skinner, T.C.M., Flores-Gonzalez, M.S., Esquivel- Valerio, J.A., Salinas-Meléndez, J.A., Salinas- Palacios, C.K., Rodríguez-Amado, J., Garza-Elizondo, M.A., 2007. Evidencia de la enfermedad de Lyme en una población de alto riesgo del noreste de México. Med.

Universiitaria 9, 105–111.

- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Caffrey, C.R., Mareš, M., Kopáček, P., 2013. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends Parasitol.* 29, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.002>
- Sonenshine, D.E., Macaluso, K.R., 2017. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00390>
- Sosa-Gutierrez, C.G., Solorzano-Santos, F., Walker, D.H., Torres, J., Serrano, C.A., Gordillo-Perez, G., 2016. Fatal monocytic ehrlichiosis in woman, Mexico, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 871–874. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151217>
- Sosa-Gutiérrez, C.G., Vargas-Sandoval, M., Torres, J., Gordillo-Peréz, G., 2015. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. *J. Vet. Sci.* 40, 487–494. <https://doi.org/10.1310/hpj4902-170>
- Sosa-Gutiérrez, C.G., Vargas, M., Torres, J., Gordillo-Pérez, G., 2014. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. *Biomed. Sci. Eng.* 884–889. <https://doi.org/10.4236/jbise.2014.711087>
- Steere, A.C., 2006. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. *Wien. Klin. Wochenschr.* 118, 625–633.
- Stenos, J., Graves, S.R., Unsworth, N.B., 2018. a Highly Sensitive and Specific Real-Time Pcr Assay for the Detection of Spotted Fever and Typhus Group Rickettsiae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 1083–1085. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.1083>
- Stephenson, N., Hodzic, E., Mapes, S., Rejmanek, D., Foley, J., 2015. Ticks and Tick-borne Diseases Short communication A real-time PCR assay for differentiating pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* from an apathogenic, woodrat-adapted genospecies from North America. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 774–778. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.003>
- Stiller, D., Crosbie, P.R., Boyce, W.M., Goff, W.L., 1999. *Dermacentor hunteri* (Acari:

- Ixodidae): an Experimental vector of *Anaplasma marginale* and *A. ovis* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) to calves and sheep. *J. Med. Entomol.* 36, 321–324.
- Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 31. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>
- Sunil, T., 2016. Exit Strategies of *Ehrlichia*, in: *Rickettsiales*. pp. 157–176.
- Swanson, S.J., Neitzel, D., Reed, K.D., Belongia, E.A., 2006. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 708–727. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-06>
- Telford III, S.R., 2009. Status of the “East side hypothesis” (transovarial interference) twenty five years later. *Ann N Y Acad Sci* 1166, 144–150. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04522.x>.
- Telford, S.R., Goethert, H.K., 2019. Ecology of *Francisella tularensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 65, 351–372. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025134>
- Thapa, S., Zhang, Y., Allen, M.S., 2019. Bacterial microbiomes of *Ixodes scapularis* ticks collected from Massachusetts and Texas, USA. *BMC Microbiol.* 19, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1514-7>
- Travanty, N. V., Ponnusamy, L., Kakumanu, M.L., Nicholson, W.L., Apperson, C.S., 2019. Diversity and structure of the bacterial microbiome of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, is dominated by the endosymbiont *Francisella*. *Symbiosis* 79, 239–250. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00642-2>
- Treuren, W. Van, Ponnusamy, L., Brinkerhoff, R.J., Gonzalez, A., Parobek, C.M., Juliano, J.J., Andreadis, T.G., Falco, R.C., Ziegler, B., Hathaway, N., Keeler, C., Emch, M., Bailey, J.A., Roe, R.M., Apperson, C.S., Knight, R., Meshnick, R., Carolina, N., Carolina, S., 2015. Variation in the Microbiota of *Ixodes* Ticks with Regard to Geography , Species , and Sex 81, 6200–6209. <https://doi.org/10.1128/AEM.01562-15>



- Vargas, M., Gordillo-Pérez, G., Solórzano, F., 2007. Evidencias de *Borrelia burgdorferi* Ssensu stricto en garrapatas del Noreste de México. *Entomol. Mex.* 6, 830–835.
- Vayssier-Taussat, M., Kazimirova, M., Hubalek, Z., Hornok, S., Farkas, R., Cosson, J.-F., Bonnet, S., Vourch, G., Gasqui, P., Mihalca, A.D., Plantard, O., Silaghi, C., Cutler, S., Rizzoli, A., 2015. Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the “one pathogen-one disease” vision to the pathobiome paradigm. *Future Microbiol.* 10, 2033–2043. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.114>
- Venzal, J.M., 2013. Epidemiology of rickettsioses by *Rickettsia parkeri* and other emerging and reemerging species associated with anthropization in Latin America. *Acta Med. Costarric.* 55, 45–47.
- Vor, T., Kiffner, C., Hagedorn, P., Niedrig, M., Ru, F., 2010. Tick burden on European roe deer ( *Capreolus capreolus* ). *Exp. Appl. Acarol.* 51, 405–417. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9337-0>
- Walker, A.R., Bouattor, A., Camicas, J., Estrada-Pena, Horak, I.G., Latiff, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2014. Ticks of domestic animals in Africa, a guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburgh Scotland, U.K.
- Wang, G., Wormser, G.P., Zhuge, J., Villafuerte, P., Ip, D., Zeren, C., Fallon, J.T., 2015. Ticks and Tick-borne Diseases Utilization of a real-time PCR assay for diagnosis of *Babesia microti* infection in clinical practice. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.03.001>
- Wang, H.-H., Teel, P.D., Grant, W.E., Schuster, G., Pérez de León, A.A., 2016. Simulated interactions of white-tailed deer ( *Odocoileus virginianus* ), climate variation and habitat heterogeneity on southern cattle tick ( *Rhipicephalus ( Boophilus ) microplus* ) eradication methods in south Texas, USA. *Ecol. Modell.* 342, 82–96.
- Wang, H., Teel, P., Grant, W., Schuster, G., 2016. Simulated interactions of white-tailed deer ( *Odocoileus virginianus* ), climate variation and habitat heterogeneity on southern cattle tick ( *Rhipicephalus ( Boophilus )* ). *Ecological.*

- Warwick, B.T., Bak, E., Baldassare, J., Gregg, E., Kioko, J., Saning, K., Kiffner, C.,  
Warwick, B.T., Bak, E., Baldassare, J., Gregg, E., 2016. Abundance estimations of  
ixodid ticks on Boran cattle and Somali sheep in Northern Tanzania 7954.  
<https://doi.org/10.1080/01647954.2015.1109708>
- Wroblewski, D., Gebhardt, L., Prusinski, M.A., Meehan, L.J., Halse, T.A., Musser, K.A.,  
2017. Ticks and Tick-borne Diseases Detection of *Borrelia miyamotoi* and other tick-  
borne pathogens in human clinical specimens and *Ixodes scapularis* ticks in New York  
State , 2012 – 2015 8, 407–411.
- Yabsley, M.J., Davidson, W.R., Stallknecht, D.E., Varela, A.S., Swift, P.K., Devos, J.C.,  
Dubay, S.A., 2005. Evidence of Tick-Borne Organisms in Mule Deer (*Odocoileus  
hemionus*) from the Western United States. *Vector-Borne zoonotic Dis.* 5, 351–362.
- Yabsley, M.J., Shock, B.C., 2013. Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife  
reservoirs. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2, 18–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>
- Yokoyama, N., Fujisaki, K., Suzuki, H., Xuan, X., Igarashi, I., Herbas, M.S., Kim, C., Iseki,  
H., 2018. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic  
Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 837–  
841. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.837>
- Yu, X., Walker, D.H., 2016. Epidemiology, Molecular Biology, and Pathogenic Mechanisms  
of Ehrlichia Infections, in: *Rickettsiales*. pp. 225–238. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46859-4>
- Zhuang, L., Wang, C.Y., Tong, Y.G., Tang, F., Yang, H., Liu, W., Cao, W.C., 2014.  
Discovery of *Rickettsia* species in *Dermacentor niveus* Neumann ticks by investigating  
the diversity of bacterial communities. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 564–568.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.004>