



Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Instituto de Ciencias Biomédicas

Departamento de Ciencias Veterinarias

Maestría en Ciencia Animal

**“Detección de ectoparásitos y patógenos rickettsiales
en venados del estado de Chihuahua”**

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Animal

Sharai Nayelli Montiel Armendáriz

“Becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”

Bajo la Dirección de la

Dra. Angélica María Escárcega Ávila

Y la Codirección de la

Dra. Cuauhcihuatl Vital García

Cd. Juárez Chihuahua, agosto 2019

APROBACIÓN DE LA TESIS

Detección de ectoparásitos y patógenos rickettsiales en venados del estado de Chihuahua, reporte de investigación preparado por Sharai Nayelli Montiel Armendáriz como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

ha sido aprobado y aceptado por:

Dr. Angélica María Escárcega Ávila
DIRECTOR DE TESIS

PhD. Cuauhcihuatl Vital García
CO-DIRECTOR DE TESIS

PhD. Antonio De la Mora Covarrubias
ASESOR

Dr. Martha Patricia Olivas Sánchez
ASESOR

Dr. Andrés Quezada Casasola
ASESOR

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

DETECCIÓN DE ECTOPARÁSITOS Y PATÓGENOS RICKETTSIALES EN VENADOS DEL ESTADO DE CHIHUAHUA

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

Dr. José Maria Carrera Chávez

COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

Dr. Ramón Rivera Barreno

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS

C.D. Salvador Nava Martínez

DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DEDICATORIA

Familia, amigos y personas especiales en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a mis tutoras la Dr. Angélica y la Dr. Cuau por haberme guiado en la elaboración de este trabajo de titulación y haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente.

A mis compañeros de maestría por el apoyo mutuo y los buenos momentos.

A las UMAs por proporcionar los sitios y las herramientas necesarias para lograrlo.

A CONACYT por el apoyo recibido durante todo el proceso de formación.

Y por último quiero agradecer a mis profesores por la estupenda organización del programa de Maestría en Ciencia Animal.

RESUMEN

DETECCIÓN DE ECTOPARÁSITOS Y PATÓGENOS RICKETTSIALES EN VENADOS DEL ESTADO DE CHIHUAHUA

Por:

Sharai Nayelli Montiel Armendáriz

Palabras clave: **venados, especie centinela, garrapatas, patógenos, PCR convencional, factores de riesgo.**

El venado bura y cola blanca son las principales especies cinegéticas en el Estado de Chihuahua. Sin embargo, se desconoce sobre su participación en el ciclo enzoótico de patógenos rickettsiales al igual que los parásitos que podrían estar involucrados. El presente estudio tuvo como objetivo describir el ciclo enzoótico de los patógenos rickettsiales en venados del estado de Chihuahua en la temporada de cacería cinegética; para ello se tomaron muestras sanguíneas de venados en vida libre y se colectaron los ectoparásitos de los individuos. Los ectoparásitos fueron clasificados por claves taxonómicas y fue realizado un análisis molecular para corroborar la identificación. La sangre de los venados y los ectoparásitos fueron analizados mediante PCR convencional para la detección de patógenos específicos. En total fueron muestreados 8 venados (tres bura y cinco cola blanca) de los cuales se recolectaron 55 garrapatas y fueron identificadas como *D. albipictus* mediante descripción de claves taxonómicas y la elaboración de un árbol filogenético en el que se encontró homología con el clado donde se agrupan *D. albipictus*, *D. nitens* y *D. variabilis*. Se detectó la presencia de *A. phagocytophilum* en el 50 % (4/8) de los venados, *Ehrlichia spp.* en el 75 % (6/8) de los venados y todas las muestras fueron negativas para *Rickettsia spp.* Para la determinación de patógenos en garrapatas solo se detectó la presencia de *Ehrlichia spp.* en 42 % (6/14) de las muestras. Los resultados de esta investigación muestran la interacción de los venados y las garrapatas en el ciclo enzoótico de *Ehrlichia spp.* En el caso de *A. phagocytophilum* solo se encontró la participación de los venados en el ciclo enzoótico del patógeno.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	IX
INDICE DE FIGURAS	X
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Importancia cinegética del venado en México	3
2.2 Generalidades del venado bura y venado cola blanca	3
2.2.1 <i>Odocoileus virginianus</i>	3
2.2.2 <i>Odocoileus hemionus</i>	4
2.3 Patógenos infecciosos en fauna silvestre	4
2.4 El venado y sus patógenos infecciosos en México.....	6
2.5 Transmisión de enfermedades por vectores.....	7
2.6 Garrapatas	8
2.6.1 Género <i>Dermacentor</i>	9
2.7 Agentes patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas	11
2.7.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	11
2.7.2 <i>Ehrlichia spp.</i>	13
2.7.3 <i>Rickettsia spp.</i>	14
3 HIPÓTESIS	15
4 OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos:.....	15
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Área de estudio	15
5.2 Obtención de muestras.....	16
5.3 Identificación morfológica y molecular de los ectoparásitos	18
5.3.1 Identificación morfológica.....	18
5.3.2 Indentificación molecular de ectoparásitos de importancia enzoótica	
18	

5.4	Detección de <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Ehrlichia</i> spp. y <i>Rickettsia</i> spp. en sangre de venado y ectoparásitos.....	20
5.4.1	Extracción de ADN.....	21
5.4.2	Cuantificación del ADN	22
5.4.3	Reacción en cadena de la polimerasa	22
5.4.4	Análisis Electroforético de los productos de PCR.....	23
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1	Identificación morfológica y molecular de las garrapatas.....	24
6.2	Detección por PCR de patógenos Rickettsiales en los venados y garrapatas 29	
7	CONCLUSIONES	36
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Prevalencia de patógenos en los venados del norte de México (Green y Sambrook, 2012; Mukul-Yerves et al., 2014).	7
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la garrapata (Nava et al., 200).	9
Cuadro 3. Especies del genero <i>Dermacentor</i> registradas en México (Guzmán-Cornejo et al., 2016).....	10
Cuadro 4. Enfermedades transmitidas por garrapatas del género <i>Dermacentor</i> (Sonenshine and Roe, 2014).	11
Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación.....	18
Cuadro 6. Lista de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético	20
Cuadro 7. Oligonucleótidos usados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa	21
Cuadro 8. Total de garrapatas recolectadas y clasificadas por estado evolutivo y sexo.	26
Cuadro 9. Diagnóstico de patógenos rickettsiales en sangre de venado	30
Cuadro 10. Diagnóstico de patógenos rickettsiales en pools de garrapatas	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de patógenos en la interfaz fauna silvestre-ganado-humano. (Diagrama modificado de: Jones et al., 2013)	5
Figura 2. Mapa de distribución de las especies de <i>Dermacentor</i> en México (Guzmán-Cornejo et al., 2016).	11
Figura 3. Estado de Chihuahua, localidades de estudio (CONABIO 1999). ALD: Aldama, BUE: Buenaventura, IGZ: Ignacio Zaragoza, NAM: Namiquipa.....	16
Figura 4. Formato del instrumento recolector de datos de campo.....	17
Figura 5. Identificación de <i>Dermacentor albipictus</i> mediante microscopia estereoscópica a) Macho adulto vista dorsal b) Hembra adulta vista dorsal c) Hembra ninfa vista dorsal d) Macho adulto vista ventral e) Hembra adulta vista ventral f) Hembra ninfa vista ventral, se aprecia la ausencia del poro genital.....	25
Figura 6. Características morfológicas de <i>D. albipictus</i> mediante microscopia electrónica. a) Placa espirácular b) Hipostoma con dentición 3/3 c) Vista ventral de un macho adulto y espuelas en coxas II, III y IV d) Vista ventral de una hembra adulta y espuelas en coxas II, III y IV e) Órgano de Haller, pulvillus y garra f) Áreas porosas presentes en hembras.	27
Figura 7. Árbol filogenético de las secuencias 16S y COX1 concatenadas, donde la secuencia problema “DERMACENTOR” muestra homología con <i>D. albipictus</i>	29
Figura 8. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de <i>A. phagocytophilum</i> en sangre de venados. La flecha negra muestra el amplicón de 262 pb. MPM Marcador de peso molecular de 50 pares de bases, (-) Control negativo.	31

Figura 9. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Ehrlichia spp.* en sangre de venados. La flecha negra muestra el amplicón de 345 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, (-) Control negativo. 31

Figura 10. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Rickettsia spp.* en sangre de venados. La flecha negra muestra el amplicón de 4001 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, (+) Control positivo (-) Control negativo. 32

Figura 11. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *A. phagocytophilum* en pools de garrapatas. En ninguna muestra se expresa el amplicón de 262 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, (+) Control positivo. 34

Figura 12. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Ehrlichia spp.* en pools de garrapatas. La flecha negra muestra el amplicón de 262 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, (+) Control positivo (-) Control negativo. 34

Figura 13. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Rickettsia spp.* en pools de garrapatas. En ninguna muestra se expresa el amplicón de 401 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, (-) Control negativo (+) Control positivo. 34

1 INTRODUCCIÓN

La cacería es una actividad ancestral que se realizaba por supervivencia y en la actualidad persiste como deporte. En México está regulada por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales conocida como SEMARNAT (Villarreal *et al.*, 2014). La fauna silvestre que es empleada para esta práctica se le conoce como *especies cinegéticas* y por medio de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAS) se ofrece el turismo cinegético (SEMARNAT, 2000). En el norte del país, las prácticas de ganadería diversificada han permitido el desarrollo y experiencia de estas actividades en las que el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y el venado bura (*O. hemionus*) se han presentado como las especies cinegéticas más importantes (Gallina-Tessaro *et al.*, 2009).

Sin embargo, la fauna silvestre hospeda una gran diversidad de agentes patógenos, los cuales representan una amenaza sustancial a la salud humana (Guzmán *et al.*, 2001; Lederberg *et al.*, 2015). Es posible que los ungulados estén infestados con ectoparásitos tales como pulgas, piojos, moscas y garrapatas, que producen lesiones en piel y transmiten agentes infecciosos (Torres-Mejía y De la Fuente, 2006; Szabó *et al.*, 2007). La transmisión de enfermedades entre venados y el ganado es de interés particular debido a que comparten hábitat y recursos (Bohm *et al.*, 2007). Del mismo modo, el contacto entre humanos, animales domésticos y fauna silvestre ha incrementado debido al turismo, y esto a su vez ha incrementado la probabilidad de las infecciones transmitidas por vectores (Wells *et al.*, 1981).

En las últimas décadas se ha observado la aparición de enfermedades infecciosas de origen zoonótico, lo cual ha causado un gran impacto en la salud humana (Daszak *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2001; Lederberg *et al.*, 2015). Tal es el caso de patógenos rickettsiales de interés zoonótico los cuales se mantienen en la naturaleza a través de un ciclo enzoótico entre garrapatas y hospedadores vertebrados, principalmente mamíferos silvestres (Kawahara *et al.*, 2006). Los venados pueden ser susceptibles a patógenos infecciosos transmitidos por la mordedura de garrapatas, las cuales se pueden dispersar a través de las interacciones sociales con individuos de su propia especie u otras especies con las que compartan el mismo ecosistema. (Bohm *et al.*, 2007). Un ejemplo de ello, es la transmisión de *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma phagocytophilum* a animales domésticos y personas a través de la mordida de la garrapata *Ixodes scapularis*.

Una herramienta eficaz para identificar enfermedades de interés económico y de salud pública es el monitoreo constante de una determinada especie mejor conocido como *animal centinela* el cual al ser más susceptible o contar con mayor exposición a un riesgo puede ser utilizado para detectar y alertar (Wolf *et al.*, 2008). Por lo que, el venado al ser portador de agentes infecciosos

y parásitos es una opción de monitoreo continuo debido al acceso anual de los animales durante las épocas de cacería. Una manera de realizar la detección de agentes patógenos es a través de la aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica ha permitido mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Inicialmente, la detección molecular de patógenos comenzó con el diagnóstico de enfermedades humanas (Rolf *et al.*, 1992). Sin embargo, recientemente la prueba de PCR ha sido aplicada para la detección de patógenos en fauna silvestre incluyendo virus, bacterias, protozoarios y hongos (Hellgren *et al.* 2004; Galli *et al.*, 2006; Beja-Pereira *et al.*, 2009). A pesar de que el venado bura y el venado cola blanca como especies cinegéticas representan una fuente de ingresos al Estado de Chihuahua, son un posible reservorio o transmisor de agentes infecciosos, poniendo en riesgo la salud humana. Por lo que es necesario estudiar y monitorear las enfermedades que podrían poner en riesgo el aprovechamiento cinegético de estas especies, la salud humana y a los animales domésticos. Así pues, la detección y monitoreo de estas enfermedades mediante el diagnóstico de técnicas moleculares, son clave para establecer programas de manejo adecuados que contemplen la salud pública.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia cinegética del venado en México

En México el venado bura y cola blanca son las especies cinegéticas más importantes, desde una perspectiva cultural y económica siendo fuente de empleos e ingresos. Desde la antigüedad la imagen de estos venados era usada en pinturas rupestres de pueblos indígenas mexicanos, tales como los huicholes, mazahuas, mexicas, kikapus, tarahumaras, tepehuanos, yaquis, coras y seris, que hacen referencia del venado en fiestas, bailes, leyendas y tradiciones religiosas (Mandujano y Rico-Gray, 1991). Su importancia biológica recae en ser un herbívoro que se encarga de dispersar las semillas de las diversas plantas que consume y sirve de presa de carnívoros como el puma, coyote y gato montés (Fulbright, 2007). En la actualidad los venados son utilizados en términos de “aprovechamiento cinegético” para hacer referencia a la extracción de este animal mediante la cacería. Esta actividad se realiza con fines deportivos obteniendo al animal como trofeo y así mismo, abastecerse de subproductos para satisfacer diversas necesidades materiales y culturales (Pérez-Gil Salcido, 1995).

En 1997, la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) puso en operación a las Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre (UMA), mismas que han innovado el aprovechamiento de la vida silvestre en México. En la actualidad, se calcula que la derrama económica en las UMA por actividades cinegéticas oscila entre los 3,500 y los 5,000 millones de pesos anuales. Los turistas nacionales representan el 59% del turismo, mientras que el 40% es de origen estadounidense y el porcentaje restante procede de diversos países de Europa y América (Villarreal *et al.*, 2014).

2.2 Generalidades del venado bura y venado cola blanca

2.2.1 *Odocoileus virginianus*

El venado cola blanca es un ungulado perteneciente a la familia de los cérvidos, el cual se distribuye desde Canadá hasta el norte de Perú (McCabe y McCabe, 1984). Este animal se caracteriza por presentar un mechón de pelos blancos en la porción interna de la cola, lo que le da su nombre común venado cola blanca (Leopold, 1959). *Odocoileus virginianus* alcanza un peso de 18 a 215 Kg, su cuello es largo y relativamente grueso, cabeza elongada, orejas grandes y patas largas (Hall 1981; Nowak, 1991). Su pelaje es de color café con diferentes tonalidades que van del grisáceo al rojizo, dependiendo de la época del año y de la localidad. Las crías, presentan un pelaje rojizo con manchas blancas hasta alrededor de los tres meses de edad (Smith, 1991). Solo

los machos presentan astas, las cuales son ramificadas en forma de una rama basal de la que salen las puntas y se mudan anualmente (Leopold, 1959). El venado cola blanca se considera una especie crepuscular, es decir, que tiene mayor actividad durante el amanecer y el atardecer; así las condiciones climáticas son favorables para el venado ya que evita la pérdida de energía por frío o de agua por temperaturas elevadas (Galindo-Leal y Weber, 1998; Gallina *et al.*, 2005).

2.2.2 *Odocoileus hemionus*

El venado bura es el cérvido de mayor tamaño en México, cuya distribución se limita al continente americano abarcando desde el sur de Alaska, el centro occidente de Canadá hasta el Norte de México (Mackie *et al.*, 1982). Siendo alto y robusto, el macho mide de 137 a 187 cm de largo y alcanza un peso de 64 a 114 kg. *Odocoileus hemionus*, posee astas dicotómicas las cuales crecen cada año y al madurar se osifican completamente (Geist, 1998). Durante la formación de las astas se desarrolla el hueso vivo el cual es blando y se rodea de piel muy vascularizada conocida como *borra*, *terciopelo* o *velvet*; una vez terminado su crecimiento las astas se vuelven una estructura sólida que se acompaña con el desprendimiento del terciopelo (Carrillo, 2013). El bura cuenta con una glándula metatarsal en la parte exterior de cada pierna trasera debajo de la corva y una glándula preorbital en el hueco del hueso lagrimal, lo que es un rasgo distintivo de la especie. La hembra mide de 116 a 183 cm de largo y llega a pesar de 45 a 70 kg, no presentan astas. Su coloración va de café rojizo a amarillo en verano o café oscuro a gris en invierno. La coloración café se extiende a la cara cerca de los ojos y a los lados de la nariz, el resto de la cara es blanco o gris. Tiene similitud con el venado cola blanca, la cola es poco poblada de pelo de un color homogéneo amarillento y el color negro rematado en la punta de la cola. También se caracterizan al saltar con las cuatro patas al mismo tiempo mientras huyen de un depredador. Los cervatillos recién nacidos tienen un peso de 2.3 a 5.0 kg con una coloración rojiza y manchas blancas que comienza a desaparecer de los 83 a 87 días de edad volviéndose grisáceo. Los juveniles a partir de los 6 meses de edad llegan a pesar de 50 a 60 kg (Gallina, 2011).

2.3 Patógenos infecciosos en fauna silvestre

La fauna silvestre es clave en la función de los ecosistemas y actualmente las actividades cinegéticas se encuentran en auge debido a su valor económico y recreativo. Sin embargo, existen cambios ecológicos de origen antropogénico tales como el cambio climático, globalización y urbanización que alteran los ecosistemas y sobre todo la manera en que las enfermedades afectan a los animales silvestres (Yale *et al.*, 2013; Lindahl y Grace, 2015). La ecología de las enfermedades estudia las interacciones entre los patógenos con los animales que pueden ser infectados y el entorno que les rodea (Hudson, 2002), en los últimos años las investigaciones se han enfocado en la interrelación de humanos, ganado, fauna silvestre y el medio ambiente, estos

componentes crean conexiones que permiten el intercambio de patógenos. (Siembieda *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2013). La transmisión de enfermedades de la fauna silvestre tiene importancia cuando estas amenazan la ganadería o la salud pública (Daszak *et al.*, 2000). Sin embargo, la transmisión de patógenos entre fauna silvestre y animales domésticos suele ser multidireccional, como se muestra en la Figura 1 (Bengis *et al.*, 2002). Las vías de transmisión son un punto clave para entender la circulación de enfermedades en los diferentes hospedadores y estas rutas de transmisión están asociadas a factores intrínsecos y extrínsecos, los primeros van a determinar la capacidad del patógeno para persistir en el tiempo o en diversas especies, los factores extrínsecos serán aquellos factores ecológicos, etológicos y de manejo que determinan la que sea efectiva la transmisión (Pruvot *et al.*, 2014). Los patógenos infecciosos pueden mantenerse en la naturaleza a través de un ciclo enzoótico entre mamíferos y ectoparásitos ya que algunas bacterias no pueden ser transmitidas verticalmente como es el caso del género *Babesia*, *Borrelia* y *Rickettsia* es necesaria la participación de ectoparásitos chupadores de sangre y vertebrados (Kawahara *et al.*, 2006; Baldrige *et al.*, 2009).

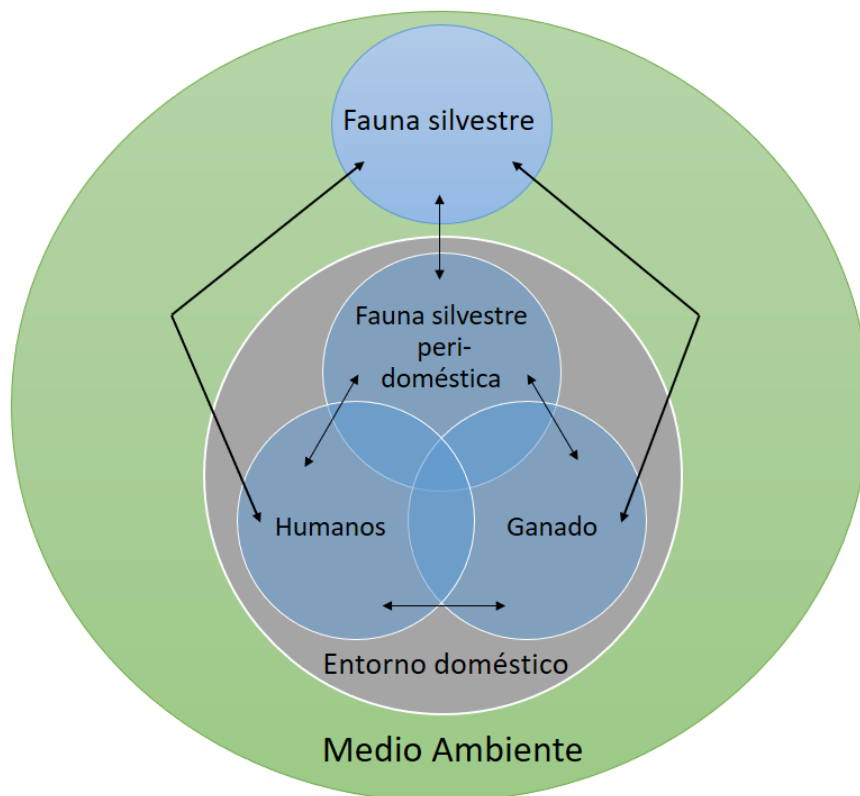


Figura 1. **Flujo de patógenos en la interfaz fauna silvestre-ganado-humano.** (Diagrama modificado de: Jones *et al.*, 2013)

2.4 El venado y sus patógenos infecciosos en México

Desde hace mucho tiempo se ha buscado conocer acerca de las enfermedades que afectan a los venados en México. Las primeras investigaciones realizadas se registran en Nuevo León y Coahuila en 1994, en el que se realizó un estudio en bovinos domésticos y venado cola blanca. Fueron descubiertos anticuerpos contra: el virus de la lengua azul, del género Orbivirus de la familia Reoviridae, el virus de la fiebre epizootica hemorrágica del género Orbivirus de la familia Reoviridae, *B. burgdorferi* y *Anaplasma marginale* (Martinez *et al.*, 1999). En el 2003, en Baja California, fueron detectados en el venado bura parasitosis externas de garrapatas del género *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor occidentalis*, *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor albipictus*, *Lipoptena spp*, *Hypoderma lineatum*, *Linognathus vituli* y se registró seropositividad del virus de la lengua azul y *A. marginale* (Contreras *et al.*, 2007). En el 2011, en Tamaulipas, se detectaron anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina del género *Pestivirus* de la familia Flaviviridae, *Neospora caninum* y *Leptospira spp*. en venados de las especies *Dama dama* y *Axis axis* (Bautista-Piña, 2014). En el 2013, nuevamente en Nuevo León, se realizó un seguimiento del venado cola blanca en cautiverio en donde se detectaron presencia de anticuerpos contra *Leptospira spp*. y *N. caninum* (Garza, 2013). Por último, en el sur del país, en el 2014, en Yucatán se realizaron exámenes parasitológicos en venado cola blanca y venado de la especie *Mazama temama* y se identificaron parásitos del género: *Strongyloides spp.*, *Trichuris spp.*, *Capillaria spp.*, *Mammomonogamus spp.* y *Eimeria spp.* (Mukul-Yerves *et al.*, 2014). En el Noreste de México se han realizado estudios para determinar la prevalencia de patógenos específicos que afectan al ganado bovino y venados, entre ellos los agentes bacterianos y parasitarios, son los que permiten un mejor diagnóstico mediante la prueba de PCR (Green y Sambrook, 2012; Ojeda-chi *et al.*, 2018). En el Cuadro 1 se muestra la detección y prevalencia de patógenos en el norte del país.

Cuadro 1. **Prevalencia de patógenos en los venados del norte de México** (Green y Sambrook, 2012; Mukul-Yerves et al., 2014).

Patógeno	Huésped	Diagnóstico		Lugar	Reportado por:
		Prevalencia	Prueba		
<i>Anaplasma marginale</i>	Cola blanca	69.7%	IFA	Nuevo León Coahuila	(Cantú-Martínez et al., 2008)
	Cola blanca	69%	IFA	Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas	(Martínez et al., 1999)
	Bura	31%	ELISA	California, EUA	(Chomel et al., 1994)
<i>Borrelia burgdoferi</i>	Cola blanca	3%	ELISA, WB	Coahuila, Nuevo León Tamaulipas	(Martínez et al., 1999)

*IFA: Prueba de Inmunofluorescencia indirecta, ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, WB: Western blot.

2.5 Transmisión de enfermedades por vectores

Un vector es cualquier agente por el cual un patógeno se transmite de un huésped a otro. El papel más importante jugado por los artrópodos en la salud humana y animal es como vectores de microorganismos patógenos. El tipo más común de transmisión se produce cuando un insecto se alimenta de un huésped humano u otro vertebrado. En la entomología médica, el agente de transmisión, o vector, es un insecto o un arácnido como el caso de las garrapatas y ácaros (Edridge y Edman, 2000).

La mayoría de las especies de garrapatas parasitan animales silvestres, sin embargo, la reducción de hábitats de los hospedadores, actividades humanas y el aumento del comercio de animales vivos puede ocasionar la extinción de algunas garrapatas, cambios en el perfil del hospedador y una adaptación a nuevas condiciones ambientales (Nava et al., 2017).

2.6 Garrapatas

Los ixódidos o garrapatas duras son ectoparásitos hematófagos de vertebrados, reconocidos a nivel mundial por su capacidad para causar dermatosis, anemia y facilitar la aparición de miasis e infecciones bacterianas secundarias (Nava *et al.*, 2017). Poseen importancia médica y veterinaria debido a la transmisión de microorganismos patógenos como rickettsias, protozoarios, bacterias, virus y la inoculación de sustancias tóxicas a sus hospederos cuando estas se alimentan (Sonenshine y Roe, 2014).

Las garrapatas pertenecen al Filum Arthropoda, Clase Arachnida, Subclase Acari, Superorden Parasitiformes, Orden Ixodida y Superfamilia Ixodoidea (Guglielmone *et al.*, 2014). Esta superfamilia contiene las familias Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae (Cuadro 2). Los Ixodidae se dividen en dos grupos basados en su morfología y características biológicas: Prostriata contiene todas las especies de *Ixodes* y se caracteriza morfológicamente por especies con surco anal anterior al ano y Metastriata formada por el resto de los géneros con surco anal posterior al ano (Nava *et al.*, 2017). La familia Ixodidae se conforma por garrapatas escudadas que poseen un capitulo sobresaliente terminal y espiráculos colocados detrás del cuarto par de coxas. Dos áreas de poros que están presentes en la superficie dorsal de la base de los capítulos de la hembra. Presentan dimorfismo sexual marcado, los machos están casi totalmente cubiertos dorsalmente por un escudo o escutum, mientras que en la hembra el escutum es pequeño y está ubicado antero-dorsalmente sobre el opistosoma. Si presentan ojos estos se encuentran lateralmente en el escudo en ambos sexos (Arthur, 1960).

Para alimentarse las garrapatas necesitan detectar a sus huéspedes en el medio ambiente por lo que requiere de sensación gustativa, olfativa, térmica y visual. Como es el caso de algunas garrapatas que presentan ojos, también lo logran a través de las vibraciones a través de las extremidades. El órgano de Haller es un conjunto de células agrupadas en la pata delantera de todas las garrapatas y está involucrado principalmente en la detección gustativa y olfativa (Sonenshine y Roe, 2014).

El ciclo de vida de Ixodidae incluye los estadios de: huevo, larva, ninfa y adulto (en macho y hembra). Las larvas, ninfas y garrapatas hembras se alimentan durante varios días antes de mudarse a la siguiente etapa o ponen varios cientos o miles de huevos antes de morir, los machos del grupo Metastriata se alimentan intermitentemente a lo largo de su vida útil (Nava *et al.*, 2017). Las garrapatas se clasifican de acuerdo con el número de hospedadores que requieran para desarrollar su ciclo de vida. Las garrapatas de un solo hospedero son aquellas que cambian de estadio de larva a adulto sin cambiar de hospedero, estas solamente se desprenden cuando están llenas de sangre para ovipositar en el suelo; las garrapatas de dos hospederos cumplen los estadios

de larva y ninfa en un solo hospedero y se desprenden para mudar en el suelo donde cambian a adultas para buscar un segundo hospedador y completar su ciclo de vida; las garrapatas de tres hospederos en el estadio de larvas parasitan a un hospedero del cual se desprenden y caen al suelo donde mudan a ninfas y a continuación suben a parasitar a un segundo hospedero, el cual es nuevamente abandonado y en el suelo cambian al estadio adulto y vuelven a parasitar a un tercer hospedero (Marcondes, 2011; Guglielmone *et al.*, 2014; Nava *et al.*, 2017).

Se reconocen alrededor de 711 especies de Ixodidae las cuales están distribuidas en todo el mundo (Guglielmone y Nava, 2014). En México se han registrado 100 especies de garrapatas cuya diversidad está constituida por las familias: Argasidae (garrapatas blandas) las cuales están representados por 32 especies en 5 géneros: *Argas* con 6 especies, *Antricola* con tres, *Ornithodoros* con 20, *Otobius* con 2 y *Nothoaspis* con una e Ixodidae representada por 68 especies en cinco géneros: *Ixodes* con 26 especies, *Amblyomma* con 26, *Dermacentor* con 10, *Haemaphysalis* con tres y *Rhipicephalus* con tres (Pérez *et al.*, 2014).

Cuadro 2. **Clasificación taxonómica de la garrapata** (Nava *et al.*, 2017).

Argasidaea	Ixodidae	Nuttalliellidae
<i>Argas</i>	<i>Amblyomma</i>	<i>Nuttalliella</i>
<i>Ornithodoros</i>	<i>Anomalohimalaya</i>	
<i>Otobius</i>	<i>Bothriocroton</i>	
<i>Antricola</i>	<i>Compluriscutulab</i>	
<i>Nothoaspis</i>	<i>Cornupalpatumb</i>	
	<i>Hyalomma</i>	
	<i>Dermacentor</i>	
	<i>Cosmiomma</i>	
	<i>Haemaphysalis</i>	
	<i>Ixodes</i>	
	<i>Margaropus</i>	
	<i>Nosomma</i>	
	<i>Rhipicentor</i>	
	<i>Rhipicephalus</i>	

2.6.1 Género *Dermacentor*

El género *Dermacentor* comprende 40 especies en el mundo. (Nava *et al.*, 2017). Se caracterizan por la presencia de ojos y festones, capítulos de base subrectangulares, palpos cortos y gruesos, y escudos generalmente adornados (Arthur, 1960). Este género presenta especies de tres hospedadores que generalmente se alimentan de mamíferos de tamaño mediano a grande mientras que los estadios inmaduros larva y ninfa se alimentan de mamíferos pequeños. Existen dos especies mexicanas de un solo hoppedador: *Dermacentor albipictus* y *D. nitens* (Guzmán-Cornejo

et al., 2016). El género *Dermacentor* en el hemisferio occidental, comprende 14 especies (Guglielmone *et al.*, 2014).

Se encuentran principalmente en Europa, Asia y América del Norte. En América del Norte, las especies más importantes son *D. variabilis*, *D. andersoni*, *D. occidentalis* y *D. albipictus* (Nicholson *et al.*, 2002). Los registros de recolección de las especies mexicanas de *Dermacentor* datan de la primera mitad del siglo XX donde se reconocen 9 especies en este país, aunque *D. andersoni* se encuentra en duda (Cuadro 3). En el trabajo realizado por Guzmán-Cornejo *et al.*, (2016), recopilan las observaciones de las especies de *Dermacentor* encontradas en México (Figura 2).

Cuadro 3. **Especies del género *Dermacentor* registradas en México** (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016)

Especies del género <i>Dermacentor</i>
<i>Dermacentor albipictus</i> ,
<i>Dermacentor dissimilis</i>
<i>Dermacentor halli</i>
<i>Dermacentor hunteri</i>
<i>Dermacentor imitans</i>
<i>Dermacentor nitens</i>
<i>Dermacentor occidentalis</i>
<i>Dermacentor parumapertus</i>
<i>Dermacentor variabilis</i>
<i>Dermacentor andersoni</i>

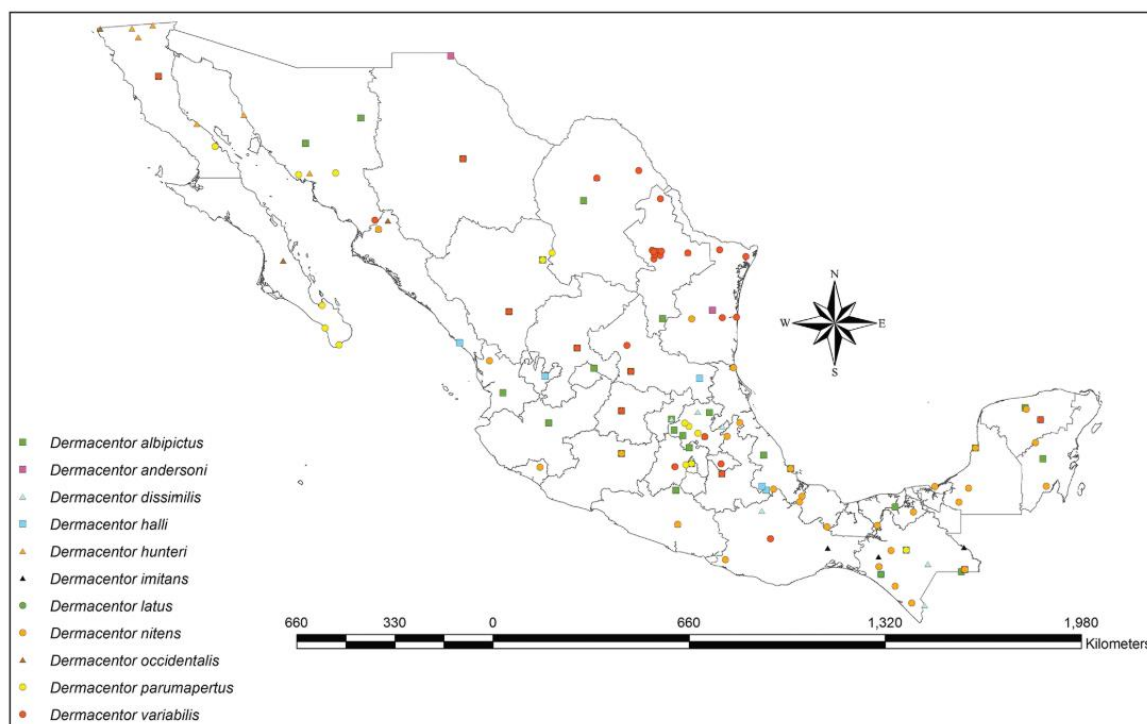


Figura 2. Mapa de distribución de las especies de *Dermacentor* en México (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016).

Se han descrito más de 16 enfermedades específicas causadas por garrapatas en humanos y más de 19 enfermedades transmitidas a animales domésticos (Nicholson *et al.*, 2002). El género *Dermacentor* incluye especies vectores de microorganismos que causan enfermedades en humanos, animales domésticos y animales silvestres, en el Cuadro 4 se muestra una lista de las enfermedades transmitidas por *Dermacentor* (Sonenshine y Roe, 2014).

Cuadro 4. Enfermedades transmitidas por garrapatas del género *Dermacentor* (Sonenshine and Roe, 2014).

Enfermedad	Microorganismo	Hospedador susceptible
Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Humanos, perros y pequeños mamíferos
Anaplasmosis	<i>A. phagocytophilum</i>	Rumiantes
Erliquiosis	<i>Ehrlichia</i> spp.	Humanos, perros, venados

2.7 Agentes patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas

2.7.1 *Anaplasma phagocytophilum*

Es un parásito intracelular, aerobio y Gram negativo, se presentan en forma de cocos, redondeados o elipsoidales de pequeño tamaño (0.2-1.5 μm). Su pared celular apenas contiene peptidoglicano,

su membrana externa es fina y sin engrosamientos y presenta abundantes pliegues. *A. phagocytophilum* presenta tres variantes dentro de la misma especie siendo anaplasmosis granulocítica humana (HGA) y anaplasmosis granulocítica equina (EGA) con ribosomas más aparentes que otros orgánulos y repartidos por todo el citoplasma y la fiebre transmitida por garrapatas (TBF) con orgánulos condensados en el centro. (Popov *et al.*, 1998; Woldehiwet, 2010). *A. phagocytophilum* fue recientemente nombrada después de una reorganización de las familias Rickettsiaceae y Anaplasmataceae en el orden de las Rickettsiales para sustituir tres especies: *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* y el agente de la Anaplasmosis granulocítica humana (Dumler *et al.*, 2001), anteriormente se creía que las enfermedades causadas por *A. phagocytophilum* estaban limitadas a los animales domésticos y reservorios silvestres (Ogden *et al.*, 1998). *A. phagocytophilum*, el agente causal de la fiebre transmitida por garrapatas, fue descrita por primera vez en 1940 en borregos, bovinos y cabras (Woldehiwet, 2010). La Ehrlichia granulocítica equina ahora reportada como Anaplasmosis granulocítica equina fue reconocida por primera vez como una enfermedad de los caballos en California (Gribble, 1969), hasta el descubrimiento de la Anaplasmosis granulocítica humana la cual fue descrita originalmente como Ehrlichiosis granulocítica humana en los Estados Unidos (Chen *et al.*, 1994). La Anaplasmosis causada por *A. phagocytophilum* es una enfermedad emergente transmitida por la mordida de garrapata y ha sido reportada en América, Europa y Asia. *Ixodes scapularis* es el vector más común que transmite la enfermedad en el Norte América (Woldehiwet, 2010). *A. phagocytophilum* persiste dentro de las glándulas salivales de la garrapata, cuando la garrapata se alimenta estimula la replicación y la migración de la bacteria desde la glándula salival hasta el tejido del hospedador, la transmisión de *A. phagocytophilum* ocurre dentro de las primeras 24 a 48 horas después de la mordida. Se ha demostrado el contagio de larvas de *I. scapularis* no contaminadas con *A. phagocytophilum*, el cual ocurre dentro de los dos primeros días después de haberse fijado al animal infectado (Katavolos *et al.*, 1998; des Vignes *et al.*, 2001; Sukumaran *et al.*, 2006).

El venado cola blanca (*O. virginianus*) es el principal hospedador de la etapa adulta de *I. scapularis* y por lo tanto se encuentra expuesto a *A. phagocytophilum*. Aunque se ha demostrado que el venado cola blanca puede soportar la infección después de desarrollar anticuerpos, sugiriendo que la inmunidad humoral puede haber jugado un papel importante en la eliminación de la bacteria (Tate *et al.*, 2005).

2.7.2 *Ehrlichia* spp.

El género *Ehrlichia* se caracteriza por ser bacterias Gram negativas, pleomórficas con frecuencia esféricas u ovoides, de crecimiento intracelular obligado (Oteo y Brouqui, 2005). La clasificación de las ehrlichias fue realizada con base en las similitudes de la secuencia genética del ARN ribosomal 16S entre los genogrupos de *Rickettsia* (*Ehrlichia*, *Cowdria*, *Anaplasma* y *Wolbachia* spp.). El Grupo I es renombrado como género *Ehrlichia* integrado por *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii*, y *Cowdria ruminantium*. El Grupo II es renombrado como género *Anaplasma*, el cual está integrado por: *A. phagocytophilum* y *A. platys*. El Grupo III renombrado género *Neorickettsia* conformado por *E. sennetsu*, *E. risticii* y *Neorickettsia helminthoeca* (Dumler *et al.*, 2001). La transmisión de las ehrlichias es a través de la mordedura de una garrapata. Desde allí infectan a los leucocitos circulantes y a las células del sistema reticuloendotelial (Walker y Dumler., 1997). Estos microorganismos penetran en el interior de las células por fagocitosis. Una vez en el interior se cree que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma y retrasan la apoptosis celular, facilitando su multiplicación. Una característica de las ehrlichias, es que se aglomeran en el citoplasma formando inclusiones denominadas mórulas. Estas mórulas se forman a los pocos días de la mordedura, y pueden ser observadas en sangre periférica, médula ósea, sinusoides hepáticos y esplénicos (Dumler *et al.*, 2001). La afinidad por estos tejidos, es la responsable de la mayoría de los signos como: leucopenia y trombocitopenia que en ocasiones pueden provocar grados importantes de inmunodepresión (Oteo y Brouqui, 2005).

Las garrapatas implicadas en la transmisión de *Ehrlichia* spp. son *Amblyomma americanum* (el principal vector), *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis* (Murphy *et al.*, 1998). Por lo que una amplia gama de mamíferos puede verse implicados y mantener en la naturaleza un ciclo biológico similar al de la borreliosis, siendo el ciclo garrapata-mamífero-garrapata la principal ruta de contagio (Lockhart *et al.*, 1997).

Los humanos que son infectados por la mordedura de las garrapatas desarrollan fiebre, malestar general, cefalea, mialgias y artralgias (Oteo y Brouqui, 2005). Sin embargo, no son el mamífero preferido para la garrapata y, por lo tanto, son hospedadores accidentales.

El venado cola blanca es un hospedero importante para las tres etapas de *A. americanum*, *R. sanguineus* y *D. variabilis* (Yabsley *et al.*, 2008). Y en consecuencia, se ha usado como animal centinela para el monitoreo de la erlichiosis monocítica humana, permitiendo determinar la distribución geográfica de los vectores (Mueller-Anneling *et al.*, 2000).

2.7.3 *Rickettsia* spp.

Rickettsias es un género de bacterias intracelulares obligadas transmitidas por artrópodos hematófagos como las garrapatas, piojos, pulgas y ácaros, este género está compuesto por 27 especies y alrededor de 17 de ellas se consideran patógenos de animales y humanos (Fang *et al.*, 2017). Se caracterizan por ser organismos intracelulares obligados de forma bacilar y con un tamaño de 0.3-0.5 x 0.8-2µm. Poseen las características típicas del grupo de las Gram negativas y una capa de glicocálix que las rodea al interior de la célula hospedera (Fournier y Raoult, 2007). Las especies patógenas se dividen en el grupo de Tifus o TG (thiphus group), transmitido por piojos y pulga y el grupo de la fiebre manchada o SFG (spotted fever group), que se transmite principalmente por ácaros y garrapatas duras (Fang *et al.*, 2017; Fenollar *et al.*, 2007).

Las rickettsias se transmiten en la saliva de las garrapatas y ácaros o heces infectados de pulgas y piojos infectados, y se transmiten a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos regionales y de forma hematogena al endotelio en todo el cuerpo (McDade y Newhouse, 1986). La bacteria utiliza las proteínas de membrana OmpA y OmpB y otros lipopolisacáridos para adherirse a la célula después de entrar, se propaga rápidamente de una célula a otra atravesando las membranas, para evitar la fagocitosis dentro de las células, secretan fosfolipasa D y hemolisina C, que interrumpen la membrana fagosómica, lo que permite un escape rápido. La multiplicación de las rickettsias causa una vasculitis, cuya expansión lleva a microhemorragias, aumento de la permeabilidad vascular, edema, activación de los mecanismos humorales de inflamación y la cascada de la coagulación (Crocquet-Valdes *et al.*, 2002; Walker *et al.* 2007). La lesión vascular y la posterior respuesta linfocítica del huésped corresponden a la distribución de las rickettsias e incluyen neumonía intersticial, miocarditis intersticial, nódulos gliales perivasculares del sistema nervioso central y lesiones vasculares similares en la piel, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, músculos esqueléticos y riñones (Fang *et al.*, 2017).

La expansión de las poblaciones de garrapatas puede introducir agentes rickettsiales a nuevas áreas geográficas y nuevas relaciones vector- patógeno (Parola *et al.*, 2005). Las garrapatas del género *Dermacentor* capaz de transmitir la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) es encontrada en el centro-sur y noreste de Estados Unidos, y recientemente se han detectado focos de infección en el suroeste de Estados Unidos de América y el noreste de México (Childs *et al.* 2007; Ereemeeva *et al.*, 2011).

3 HIPÓTESIS

Los venados del estado de Chihuahua y sus ectoparásitos, están involucrados en el ciclo enzoótico de patógenos rickettsiales

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir el ciclo enzoótico de los patógenos rickettsiales en venados del estado de Chihuahua en la temporada de cacería cinegética

4.2 Objetivos específicos:

- Colectar ectoparásitos y muestras sanguíneas de venados cobrados en UMAs del estado de Chihuahua.
- Identificar morfológicamente los ectoparásitos colectados en las diferentes especies de venados.
- Identificar molecularmente los ectoparásitos involucrados en el ciclo enzoótico de patógenos rickettsiales.
- Detectar molecularmente patógenos rickettsiales en muestras de sangre de venados y en ectoparásitos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

La colecta de campo se realizó en ranchos cinegéticos registrados como UMA ubicados en los municipios de Aldama, Buenaventura, Ignacio Zaragoza y Namiquipa (Figura 3).

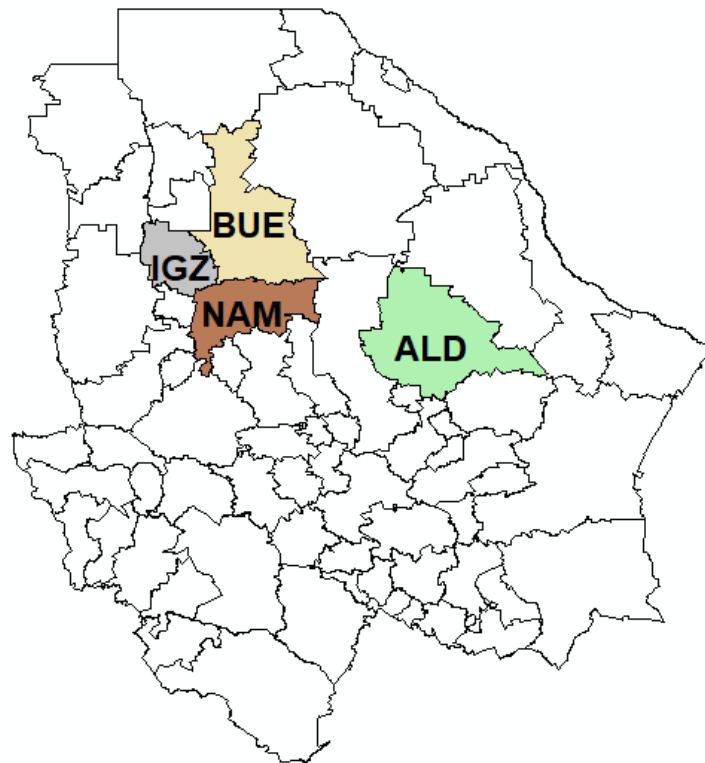


Figura 3. **Estado de Chihuahua, localidades de estudio**

ALD: Aldama, BUE: Buenaventura, IGZ: Ignacio Zaragoza, NAM: Namiquipa

5.2 Obtención de muestras

Las muestras fueron colectadas de venado bura y cola blanca cobrados legalmente por cazadores durante las temporadas cinegéticas de diciembre a febrero del 2017-2018. Inmediatamente después de cobrar un ejemplar, la sangre fue tomada *post-mortem*, por punción en la vena yugular y colectada en tubos vacutainer® con EDTA; también se removieron manualmente y colectaron ectoparásitos de los individuos los cuales fueron almacenados en microtubos. Las muestras de sangre y los ectoparásitos se mantuvieron a una temperatura de 4 °C hasta llegar al laboratorio, una vez en el laboratorio se conservaron a -20 °C.

La información fue registrada del sitio donde se realizó el muestreo de los venados en el que se incluía, coordenadas, identificación de la especie de los venados muestreados, presencia de ectoparásitos, localización de los ectoparásitos en el venado y carga parasitaria. Esta información fue documentada en el instrumento recolector de datos como se muestra en la Figura 4. Los datos obtenidos por medio del instrumento fueron capturados en una hoja de calculo Excel para realizar análisis de estadística descriptiva para la obtención de frecuencias.

5.3 Identificación morfológica y molecular de los ectoparásitos

5.3.1 Identificación morfológica

La identificación de los ectoparásitos fue realizada bajo observación estereoscópica siguiendo las claves taxonómicas descritas por Yunker *et al.* (1986), Hoskins (1991) y Páez y Villa (2017). Los ectoparásitos fueron clasificados en garrapatas blandas, garrapatas duras y larvas de mosca. Se diferenciaron los ectoparásitos que intervienen en el ciclo de patógenos rickettsiales para la identificación morfológica y molecular. Las garrapatas duras fueron determinadas en la participación de la transmisión de patógenos rickettsiales de acuerdo a Sonenshine y Roe (2014). Estas fueron diferenciadas y contabilizadas por estado evolutivo entre larva, ninfa y adulto hembra o macho con ayuda de un equipo Zeiss Stemi 508. Para la identificación y descripción de características morfológicas de los ectoparásitos de interés se tomaron fotografías mediante microscopía electrónica con un equipo Hitachi SU 3500.

5.3.2 Identificación molecular de ectoparásitos de importancia enzoótica

Para la confirmación molecular la especie de garrapatas duras se realizó la extracción de ADN de una de las garrapatas mediante el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) siguiendo las especificaciones del producto. Previamente, para la remoción del exoesqueleto de quitina; la garrapata fue diseccionada y macerada dentro de un microtubo, donde se añadió 300 ul de buffer lisis y 25 ul de proteinasa k del kit de extracción, posteriormente la muestra se mantuvo en un termoblock a una temperatura de 80 °C durante 30 minutos y después a -80 °C durante 30 minutos, este proceso fue repetido 3 veces. La cuantificación del ADN de la muestra se realizó por espectrofotometría con ayuda de un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®). Fue realizado una PCR convencional para amplificar el gen 16S mitocondrial y el gen Citocromo oxidasa subunidad 1 (COX-1). Los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio están descritos por los autores citados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación

Gen diana	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Amplicón	Referencia
16SrRNA	IXOst1F	TGATTTTTTAAATTGCTGTGGT	337 pb	(Ivanova <i>et al.</i> , 2013)
	IXOst2R	GTATCCTAATCCAACATCGA		
COX-1	COX1F	GGAACAATATATTTAATTTTTGG	820 pb	(Diseñados en laboratorio)
	COX1R	ACTTATCCCTACTGTAATATATG		

Todas las reacciones de PCR se elaboraron utilizando 7 μL de SapphireAmp 2x, 0.7 μl de oligonucleótidos antisentido y sentido 10 μM , 4.6 μL de MgCl_2 25 μM , 2 μL de ADN y agua estéril para alcanzar un volumen final de 15 μL . Se incluyeron controles positivos y negativos en cada ejecución.

El protocolo de amplificación del gen 16S consistió en una desnaturalización inicial a una temperatura de 94 °C durante 5 min; un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 43 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 45 segundos con 35 repeticiones; extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Para el gen COX-1, el protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a una temperatura de 94 °C durante 5 minutos; un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y extensión a 68 °C durante un minuto; la extensión final se realizó a 68 °C durante 7 minutos.

Todos los productos de PCR amplificados se analizaron mediante electroforesis con geles de agarosa preparado al 1.5% la cual se encarga de separar los fragmentos de ADN por tamaño por lo que la concentración o porcentaje del gel permite el desplazamiento adecuado de los fragmentos de ADN. Los geles se tiñeron con SYBR Green un compuesto orgánico que se acopla a los ácidos nucleicos aumentando la fluorescencia para su visualización y cuantificación. Por último los geles fueron observados mediante un transiluminador UV para corroborar la presencia del producto esperado haciendo visible la fluorescencia de los fragmentos de ADN.

Los productos de PCR amplificados se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania) y se secuenciaron directamente en ambas direcciones utilizando el método sanger. Las secuencias sentido y antisentido se ensamblaron en secuencias de consenso utilizando el programa BioEdit y se enviaron a GenBank (números de acceso: MK874742 y MK864089). Un conjunto de datos de 17 secuencias de 16S rDNA y COX-1 fueron descargados de la base de datos GeneBank NCBI y utilizados para el análisis filogenético. Se incluyó una secuencia de Outgroup para el análisis de dos genes (Cuadro 6). Las secuencias consenso se alinearon en BioEdit a través de la alineación CAP / CLUSTAL, las brechas fueron editadas a simple vista. Usando secuencias de genes individuales y concatenadas, el árbol filogenético basado en el 16S y el COX-1 se construyó con la máxima probabilidad y el árbol bayesiano utilizando el software MrBayes 3.2.7. El modelo de mejor ajuste de sustitución de nucleótidos fue identificado por JModeltest 2.1.10 como GTR + I + G (gen 16S y genes concatenados) y HKY + I + G (gen COX-1). Para el análisis bayesiano, el método de cadenas de Markov Monte Carlo fue de 2 000 000 generaciones y este se consideró como completado cuando

la desviación estándar indicó $p < 0.01$. Los arboles generados fueron visualizados y editados usando el software FigTree 1.4.2.

Cuadro 6. **Lista de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético**

Gen 16S		Gen COX-1	
No. Acceso	Especie	No. Acceso	Especie
AY375428.1	albipictus 1	GU968827.1	albipictus 1
GU968849.1	albipictus 2	GU968828.1	albipictus 2
GU968852.1	albipictus 3	GU968829.1	albipictus 3
EU711346.1	andersoni 1	KX360381.1	andersoni 1
EU711347.1.	andersoni 2	KX360395.1	andersoni 2
LN823998.1.	andersoni 3	KX360398.1	andersoni 3
MH668402.1	marginatus 1	KF583568.1	marginatus 1
MH668401.1.	marginatus 2	KF583569.1	marginatus 2
KU183519.1	marginatus 3	KU364300.1	marginatus 3
KT906175.1.	nitens 1	KT906189.1	nitens 1
AY375436.1	nitens 2	KT906190.1	nitens 2
MH513301.1	nitens 3	KF200094.1	nitens 3
MH324408.1	silvarum 1	KP258209.1	silvarum 1
MH324409.1	silvarum 2	JQ737081.1	silvarum 2
L34300.1	variabilis 1	MG834191.1	variabilis 1
MG834244.1	variabilis 2	MG834072.1	variabilis 2
FN665384.1	variabilis 3	KM840138.1	variabilis 3
Out group			
MK343715	Rhipicephalus sp.	KX228550.1	Rhipicephalus sp.

5.4 Detección de *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp. en sangre de venado y ectoparásitos

Las muestras de sangre de venado y garrapatas recolectadas fueron procesadas para realizar la detección de *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. y *Rickettsia* spp. mediante la amplificación de ADN de los genes diana en las muestras utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa convencional. Las características de los oligonucleótidos utilizados y los tamaños de los amplicones esperados están descritos en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Oligonucleótidos usados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Patógeno	Gen diana	Oligonucleótidos 5'-3'	Amplicón (pb)	Referencia
<i>A. phagocytophylum</i>	16S rRNA	GGCATGTAGGCGGTTCGGTAAGTT CCCCACATTCAGCACTCATCGTTTA	262	Ghafar y Amer, 2011
<i>Ehrlichia spp.</i>	16S rRNA	GGTACCYACAGAAGAAGTCC TAGCACTCATCGTTTACAGC	345	Inokuma et al., 2000
<i>Rickettsia spp.</i>	gltA CS-78 CS-323	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAG GAT	401	Labruna et al., 2007

5.4.1 Extracción de ADN

Las extracciones de ácidos nucleicos de sangre de los venados se realizó mediante el método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 24:24:1, descrito previamente por Sambrook y Russell, 2001. El método consistió en tomar 250 µl de sangre entera previamente homogenizada, de esta fue añadida 300 µl en un microtubo donde se agregaron 600 µl de solución buffer lisis (Tris HCl 0.2 M, EDTA 10 mM, NaCl 0.5 M y SDS 1%) y 2.5 µl de proteinasa K 20 mg/mL. La muestra fue mezclada utilizando un equipo vortex durante dos segundos y se mantuvo en incubación en un equipo Thermoblock a 56 °C durante 30 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente y la muestra fue cambiada al equipo Thermoblock a 100 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 24:24:1 y se homogenizó la muestra en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos, realizado esto, se obtuvo la fase acuosa de la muestra y se colocó en un nuevo microtubo, este proceso se repitió 2 veces más. En el último lavado la fase acuosa fue recuperada y contabilizada, se añadieron 1/10 de acetato de sodio (3 M 5.4 pH) del volumen obtenido y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Por último, se mezcló la muestra por inversión y se almaceno a -20°C durante 24 horas; transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, fue retirado el sobrenadante y fueron añadidos 500 µl de etanol frio al 75%, para después centrifugar a 7,500 rpm durante 5 minutos, Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se dejó secar por 15 minutos para después resuspenderlo en 20 - 30 µl de agua estéril destilada. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior cuantificación.

La extracción de ADN de las garrapatas para la detección de patógenos fue realizada con el método cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (Sambrook y Russell, 2001). Se realizaron pools organizados en grupos de menos de 5 garrapatas, pudiendo estar en cada pool 1, 2, 3, 4, o 5 garrapatas en cada mezcla cada grupo fue colocado en un microtubo donde fueron cortadas con una hoja de bisturí #15 y maceradas con un pistilo, se añadieron 500 µl de solución buffer lisis

(2% triton x-100, 1% de SDS, 100 mM NaCl y 10 mM Tris-HCl pH 8) y 10 µl de proteinasa K 20 mg/mL y se mezclaron por vortex. Las muestras se colocaron en el termoblock a una temperatura de 70 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con 400 µl de fenol mercaptoetanol 0.2%, se mezcló por vortex a continuación la muestra se centrifugo a 13,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se tomó la fase acuosa contabilizada y se colocó en un microtubo nuevo donde se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 24:24:1 se mezcló por vortex y se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa fue recuperada y contabilizada y se le adiciono 1/10 de acetato de sodio (3 M pH 5.4) y dos volúmenes de etanol absoluto frio. La muestra fue almacenada a -20°C durante 24 horas y posteriormente centrifugada a 14,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se dejó secar por 15 minutos para después resuspenderlo en 30 a 50 µl de agua estéril destilada. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior cuantificación.

5.4.2 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®) y se verificó la concentración (ng/µl) y la relación de absorbancia 260/280 longitudes de onda para la determinación de la pureza del ADN. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior uso para realizar la técnica de PCR.

5.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de ADN de los genes diana en las muestras de sangre de venado y garrapatas se utilizaron 200 ng del ADN muestra, adicionando 1 µl de cebador sentido (20 mM) y 1 µl antisentido, 12.5 (20 mM) µl de Master mix (dNTP's 10 mM, MgCl₂ 3 mM y Taq Polimerasa 50 U/µl) y se adicionó la cantidad necesaria de agua estéril para obtener una reacción con un volumen total de 25 µl. Se utilizó un control negativo para cada reacción donde solo se sustituyó el ADN por agua estéril y un control positivo para cada reacción con una muestra de ADN previamente establecida.

El programa de amplificación para la detección de *A. phagocytophilum* consistió en la desnaturalización inicial a una temperatura (T_m) de 94 °C durante 2 minutos; un ciclo de 30 repeticiones con una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C; la extensión final fue a 72 °C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se enfriaron a 4 °C .

El programa de amplificación para la detección de *Ehrlichia spp.* consistió en: la desnaturalización inicial a una T_m de 94 °C durante 4 minutos; un ciclo de 40 repeticiones con

una desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 68 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto; la extensión final fue a 72 °C durante 8 minutos. Posteriormente las muestras se enfriaron a 4 °C.

El programa de amplificación para la detección de *Rickettsia spp.* consistió en: la desnaturalización inicial a una Tm de 95 °C durante 3 minutos; un ciclo de 40 repeticiones con una desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 48 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos; la extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Posteriormente las muestras se enfriaron a 4 °C.

5.4.4 Análisis Electroforético de los productos de PCR

Los productos de amplificación de la técnica de PCR se visualizaron mediante la utilización del sistema de gel en electroforesis horizontal al 2.0% de agarosa, preparados con 40 ml de buffer TAE 1X, 0.8 gr de agarosa y 10 µl de bromuro de etidio al 0.1%. Los geles se cargaron con 10 µl del producto de PCR y un marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Los geles se corrieron a 100 volts durante 40 minutos y se visualizaron en el trasiluminador, estos fueron fotografiados con cámara y procesados con el programa Kodak Molecular Imaging.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera recolección realizada en la temporada de cacería del periodo noviembre a febrero del 2017-2018, fueron obtenidos un total de cinco individuos (tres venados bura y dos cola blanca). Las muestras de los venados se adquirieron en rancho los Gemelos del municipio de Aldama, del rancho Cerro grande en Buenaventura y del rancho Tintero de Namiquipa. La segunda recolección de la temporada cinegética de noviembre a febrero del 2018-2019 se obtuvieron un total tres venados cola blanca del rancho Agua de Pérez y rancho Pardo de Buenaventura y del rancho Vega de Ignacio Zaragoza. En total fueron muestreados 8 venados con un total de 55 garrapatas duras. Cinco garrapatas blandas *Otobius sp.* y dos larvas de moscas *Oestrus sp.* en dos de los venados. Solo uno de los venados no presentó ningún ectoparásito. En el estado de Chihuahua se realizan actividades cinegéticas siendo el venado cola blanca el mamífero de caza más solicitado. En este estudio el número de venados obtenidos a través de la cacería cinegética se considera bajo si se compara con estudios realizados en ranchos dedicados a la explotación intensiva o semi-intensiva de cola blanca en estados como Nuevo León y Tamaulipas donde reportan muestreos de 204 animales (Ramos, 2013). Sin embargo, la proporción de venados en actividad cinegética que se reportan para el estado de Chihuahua es

mucho menor que la reportada en Nuevo Leon y Tamaulipas, estados que tienen los primeros lugares con mayor número de sitios donde se realiza la cacería legal (Villarreal *et al.*, 2014). En el estado de Chihuahua se otorgaron 197 permisos de cacería para mamíferos, mientras que Nuevo Leon otorgó 2860 y 2385 Sonora en la temporada 1999-2000 (SEMARNAT, 2010) Por otra parte, en Baja California reportan 15 venados muestreados a través de cacería cinegética para la detección de patógenos y parásitos (Contreras, *et al.*, 2007). Por lo que al realizar estudios en animales obtenidos por medio de la cacería se considera que el número de muestreo puede ser bajo debido a la disponibilidad de sitios de cacería legales y número de permisos entregados a cazadores además otros factores de carácter social.

En México la información sobre fauna silvestre, los parásitos y enfermedades que portan es escasa y se desconocen las implicaciones para las actividades humanas. Existen estudios de ectoparásitos en venado bura donde se lograron identificar las especies de garrapatas: *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor occidentalis*, *Dermacentor variabilis* y *Dermacentor albipictus* en el estado de Baja California (Contreras, *et al.*, 2007). Otro estudio realizado en ungulados en Yucatán (incluyendo al venado cola blanca) obtuvieron muestras positivas a nematodos del orden Strongylida y protozoos del orden Eucoccidiorida y detectaron ectoparásitos como la pulga *Pulex irritans*, el piojo *Gliricola porcelli* y la garrapata *Amblyomma* en venados y pecaríes (Mukul-Yerves *et al.*, 2014). Sobre estudios zoonosarios que impliquen a la fauna silvestre solo se han realizado en borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) en Baja California donde se detectó seroprevalencia de enfermedades de riesgo para el hombre, como *Leptospira sp.* (Colodner, 2001).

6.1 Identificación morfológica y molecular de las garrapatas

Todas las garrapatas duras fueron identificadas como *Dermacentor albipictus* mediante microscopía estereoscópica de acuerdo las claves taxonómicas descritas por Yunker *et al.* (1986) (figura 5). Basándose principalmente en la prolongación ancha y corta de la placa del espiráculo, el hipostoma con una dentición 3/3 y la presencia de espuelas en las coxas II y III estas características se observaron con mayor detalle en las fotografías de microscopía electrónica (Figura 6). Las garrapatas fueron diferenciadas y contabilizadas entre ninfa, hembra y macho adulto donde se encontró un total de 39 hembras adultas, 14 machos adultos y 2 ninfas hembras (Cuadro 8). Estas garrapatas se encontraron en su mayoría en la cabeza, región perianal y región escapular como se ha descrito previamente en la literatura (Bishop y Wood, 1913; Bishopp y Trembley, 1945).

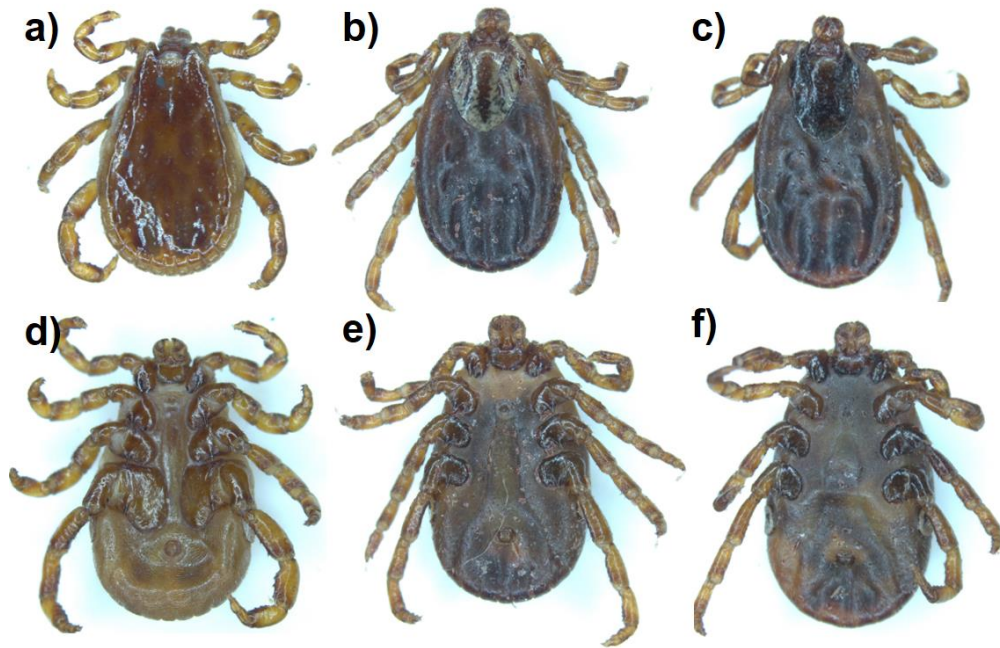


Figura 5. **Identificación de *Dermacentor albipictus* mediante microscopia estereoscópica a) Macho adulto vista dorsal b) Hembra adulta vista dorsal c) Hembra ninfa vista dorsal d) Macho adulto vista ventral e) Hembra adulta vista ventral f) Hembra ninfa vista ventral, se aprecia la ausencia del poro genital.**

D. albipictus puede ser diferenciada de otras especies del género *Dermacentor* por su morfología, la principal característica del estadio adulto de *D. albipictus* es que carece de la prolongación dorsal de la placa espiracular y las aberturas del espiráculo son menos y más pequeñas a diferencia de *D. andersoni* el cual presenta una prolongación dorsal del espiráculo más pronunciada y con menos número de aberturas, pero más alargadas, sin embargo, esta forma puede ser variable. De igual manera *D. variabilis* presenta similitud con *D. andersoni* lo cual dificulta su identificación (Dergousoff y Chilton, 2007). La distribución de estas tres especies puede localizarse en las mismas áreas geográficas, en México existen registros de especímenes de *D. andersoni* y *D. variabilis* obtenidos del desierto Chihuahuense (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016) y un estudio realizado en Canadá reporta la presencia de estas tres especies y su relación con las zonas bioclimáticas (Wilkinson, 1967). Tanto *D. andersoni* como *D. variabilis* son garrapatas que requieren 3 huéspedes para completar su ciclo de vida, las larvas y las ninfas se alimenta de sangre de pequeños mamíferos como ratones y ardillas y el estadio adulto suele alimentarse de mamíferos de mediano a gran tamaño como mapaches, zorrillos, caballos, bovinos y venados (Kollars *et al.*, 2000). En contraste *D. albipictus* reporta una distribución desde Alaska hasta el centro de México y generalmente se ha encontrado parasitando fauna de gran tamaño como caribús, alces, venados cola blanca y bura; y animales domésticos como ganado vacuno y caballos (Guglielmone *et al.*, 2014). En Estados Unidos y Canadá *D. albipictus* genera severas infestaciones en alces que

pueden causar anemia, pérdida de peso, estrés y aseo excesivo (Addison *et al.*, 1979; Drew y Samuel, 1985). Durden *et al.* (1991) reportan en Alabama Estados Unidos la infestación de venado cola blanca por las garrapatas *I. scapularis*, *D. albipictus*, *A. americanum* y *A. maculatum* donde *D. albipictus* fue la segunda más abundante después de *I. scapularis* con una infestación de 200 garrapatas colectadas por venado. Cortinas y Kitron, (2006) en Illinois Estados Unidos reportan la infestación de venado cola blanca por *I. scapularis* y *D. albipictus* donde encontraron infestaciones de 5 *I. scapularis* y 5.8 *D. albipictus* en promedio, mencionando estas parasitosis como bajas comparada con otros estados del norte. En este estudio se reportan un total de 55 garrapatas recolectadas de 8 venados cola blanca y bura donde la mayor carga parasitaria era de 22 garrapatas en un venado bura y las menores eran de menos de 3 garrapatas en venados cola blanca (Cuadro 8), con un promedio de 6.8 garrapatas por venado. Guerra *et al.* (2002) menciona que una posible explicación al tamaño de la carga parasitaria puede estar en la calidad y disponibilidad del hábitat de la garrapata en el área.

Cuadro 8. **Total de garrapatas recolectadas y clasificadas por estado evolutivo y sexo.**

Venado	Hembra	Macho	Ninfa
<i>O. hemionus</i>	9	6	1
<i>O. hemionus</i>	2	6	
<i>O. hemionus</i>	20	1	1
<i>O. virginianus</i>	2	-	-
<i>O. virginianus</i>	2	-	-
<i>O. virginianus</i>	-	-	-
<i>O. virginianus</i>	2	-	-
<i>O. virginianus</i>	2	1	-
Total	39	14	2

La presencia de garrapatas puede estar relacionada con el ambiente en el que la garrapata se desarrolla (Kollars *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2002; Cortinas & Kitron, 2006; Guglielmone *et al.*, 2014). Dentro del ciclo de vida de *D. albipictus* necesita de pastizales altos para poder subirse al hospedero; esto ocurre principalmente en los meses de septiembre y octubre lo cual concuerda con los meses en que los pastizales están más altos en el estado de Chihuahua (Wilkinson, 1967; Patrick and Hair, 1975; Leo *et al.*, 2014).

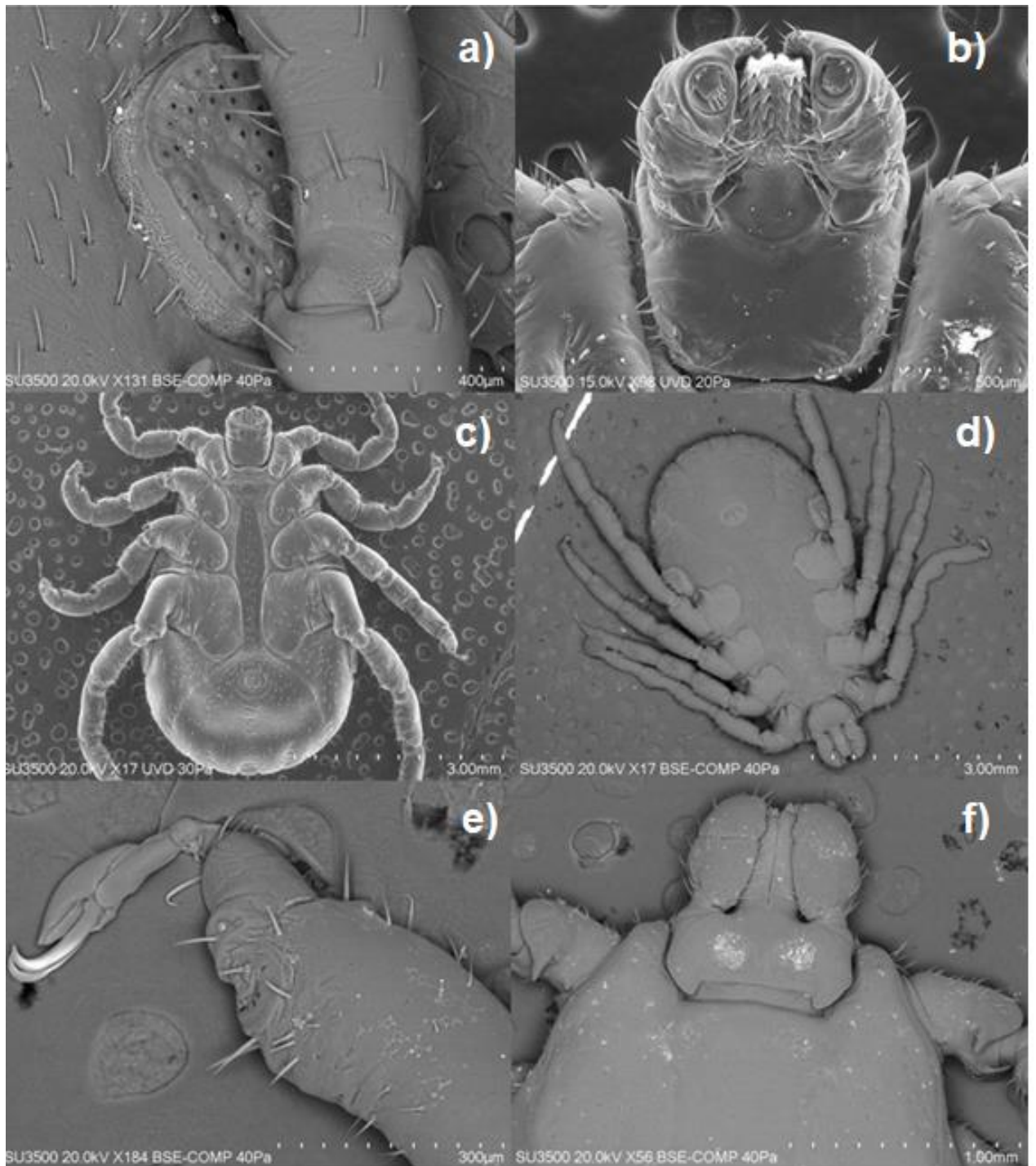


Figura 6. Características morfológicas de *D. albipictus* mediante microscopía electrónica. a) Placa espiracular b) Hipostoma con dentición 3/3 c) Vista ventral de un macho adulto y espuelas en coxas II, III y IV d) Vista ventral de una hembra adulta y espuelas en coxas II, III y IV e) Órgano de Haller, pulvillus y garra f) Áreas porosas presentes en hembras.

La identificación molecular de *D. albipictus* se realizó a través de árboles filogenéticos contruidos a partir de un modelo bayesiano con los genes 16S y COX-1 concatenados. La secuencia concatenada presento homología con las secuencias de *albipictus* 1, 2 y 3 obtenidas de

GenBank. El árbol filogenético muestra la presencia de dos clados donde el primero agrupa las especies de *D. marginatus* y *D. silvarum* y el segundo clado se agrupa con un ancestro en común a *D. albipictus*, *D. nitens* y *D. variabilis*. (Figura 7).

La taxonomía de *D. albipictus* ha sido controversial, Packard (1896) la describió por primera vez en dos formas como *Ixodes albipictus* e *Ixodes nigrolineatus* en la que su principal diferencia era la cutícula transparente además del tamaño y la variación geográfica. Posteriormente, estas especies fueron colocadas dentro del género *Dermacentor*. Sin embargo, Cooley (1938) no consideró esta diferencia suficientemente significativa para que fueran reconocidas como dos especies. En Estados Unidos la forma *albipictus* tiene una distribución en los estados del norte y oeste y *nigrolineatus* en los estados del sudeste, aunque Cooley (1938) registró ambas formas en las mismas regiones de California y Nuevo México. Ernst y Gladney, (1974) demostraron más tarde que las dos formas de *D. albipictus* podrían hibridar y producir descendientes viables. Crosbie *et al.*, (1998) demostró que *D. albipictus* muestra una considerable variación fenotípica y de acuerdo a la evidencia morfológica y genética se sugiere que *D. albipictus* comprende al menos dos especies genéticamente distintas. Leo *et al.* (2010) reevaluaron la variación de ADN reportada por Crosbie utilizando el gen 16SrDNA, COX-1 y ITS-2 donde también se mostraron linajes distintos y que esta variación divergente se encuentra geográficamente extendida al menos desde Alberta hasta el estado de Washington.

El árbol filogenético de este estudio muestra a nuestra secuencia problema “DERMACENTOR” agrupada en el clado con un ancestro en común a *D. albipictus*, *D. nitens* y *D. variabilis*, este fue muy similar con el realizado con Leo *et al.* (2010) donde *D. albipictus*, *D. nitens* fueron agrupados en el mismo clado por el gen 16S y COX-1, ellos sugieren que es posible que el ADN mitocondrial de otra especie de *Dermacentor* se haya incorporado de forma selectiva en *D. albipictus* y que probablemente esa especie sea *D. nitens*. Aunque las características morfológicas de *D. albipictus* y *D. nitens* difieran en la forma del espiráculo, consideran interesante que ambas especies comparten su ciclo de vida de un solo huésped, que es inusual dentro del género *Dermacentor*.

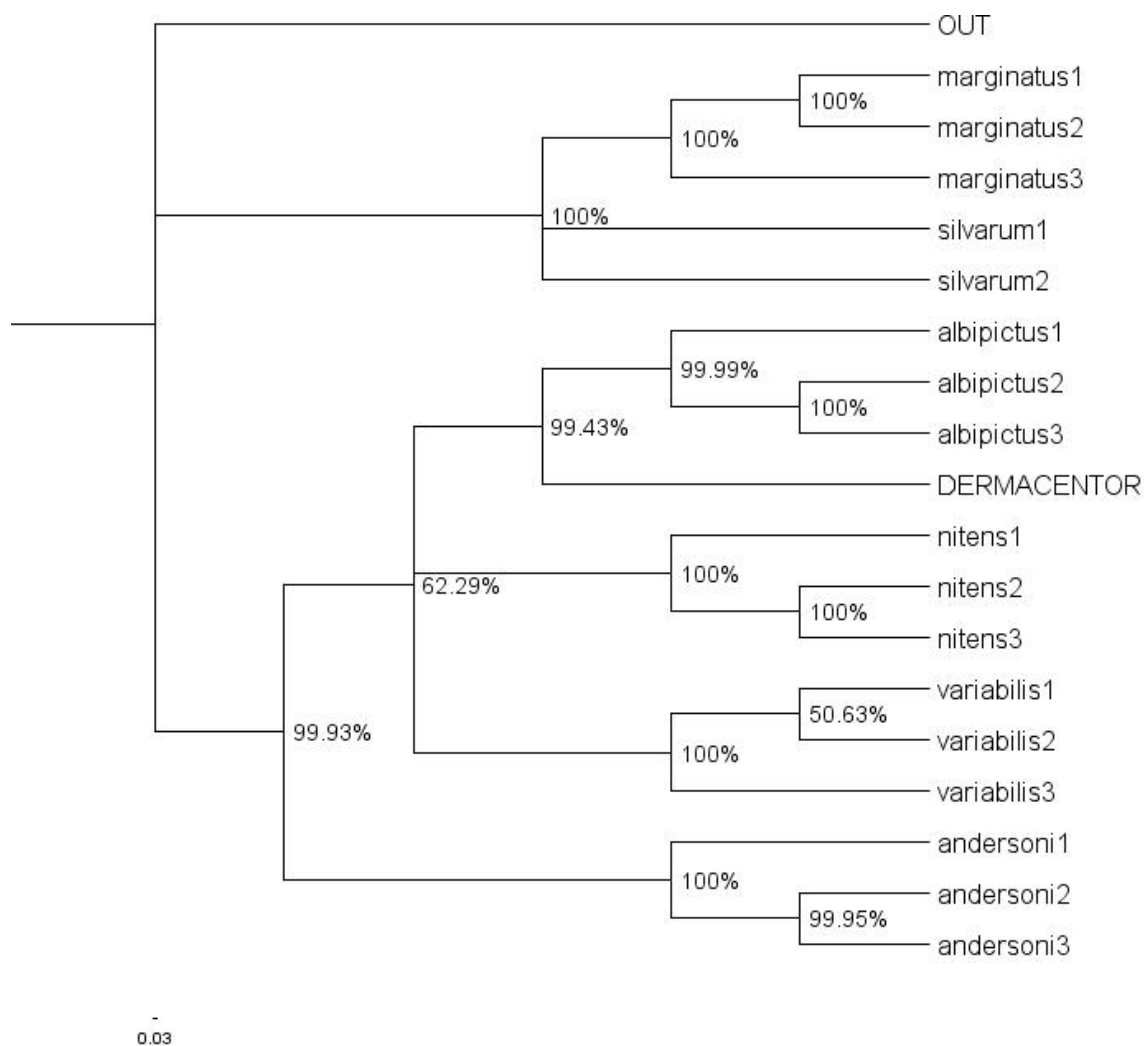


Figura 7. **Árbol filogenético de las secuencias 16S y COX1 concatenadas, donde la secuencia problema “DERMACENTOR” muestra homología con *D. albipictus*.**

6.2 Detección por PCR de patógenos Rickettsiales en los venados y garrapatas

La mayoría de las enfermedades rickettsiales son transmitidas por garrapatas las cuales están involucradas con la fauna silvestre y específicamente con cérvidos (Foley *et al.*, 2015; Sayler *et al.*, 2016). Varias especies del orden Ixodes se alimentan de sangre de venado, lo que sugiere que estos pueden servir como reservorios de múltiples agentes patógenos (Furman y Loomis, 1984). En el presente estudio se realizó la detección molecular de patógenos en muestras de sangre de venado cola blanca y bura, resultaron positivas a *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia spp.* y ninguna para *Rickettsia spp.* (Cuadro 9). Estos resultados concuerdan con los descritos por Ojeda-chi *et al.* (2018) en Yucatán donde muestra por detección molecular la presencia de patógenos rickettsiales como *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum* y *A. odocoilei* en venado cola blanca (*O. virginianus yucatanensis*) y venado mazama (*Mazama temama*).

Cuadro 9. **Diagnóstico de patógenos rickettsiales en sangre de venado**

ID	Especie	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Ehrlichia spp.</i>
1	<i>O. hemionus</i>	-	-
2	<i>O. hemionus</i>	+	+
3	<i>O. hemionus</i>	-	+
4	<i>O. virginianus</i>	-	+
5	<i>O. virginianus</i>	-	-
6	<i>O. virginianus</i>	+	+
7	<i>O. virginianus</i>	+	+
8	<i>O. virginianus</i>	+	+

*El símbolo (-) muestra los resultados negativos, el símbolo (+) muestra los resultados positivos

Otro ejemplo es el reportado por Martinez *et al.* (1999) en donde mediante la detección de anticuerpos en suero sanguíneo de venados cola blanca obtuvo la prevalencia de *B. burgdorferi*, *A. marginale*, *B. abortus*, *B. melitensis*, y *B. ovis*. en estados del noroeste (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas). Diversas investigaciones han sido realizadas en venados como reservorios y dispersadores de enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas ya que estos a través de desplazamientos en el hábitat pueden afectar la distribución de los vectores y de los patógenos, así como incrementar el riesgo de transmisión a animales domésticos y humanos (Hamer *et al.*, 2012; Medrano *et al.*, 2012). Por ejemplo en California, Estados Unidos llevaron a cabo un estudio acerca de la diversidad de los patógenos rickettsiales en el “venado cola negra” (*O. hemionus columbianus*) donde reportan la detección de *Anaplasma spp.* y *Ehrlichia spp.* mostrando el rol de los venados en la ecología de los patógenos rickettsiales (Foley *et al.*, 2015).

De las muestras analizadas en este estudio, El 50 % (4/8) de los venados fueron positivos a *A. phagocytophilum*, donde se consideró como resultado positivo la presencia de la banda en 262 pares de bases (Figura 8). Para *Ehrlichia spp.* el 75 % (6/8) de los venados) fueron positivos, consideras así por la presencia de la banda en 345 pares de bases (Figura 9). Se ha demostrado que una amplia gama de mamíferos, especialmente los ciervos sirven como reservorios del ciclo de *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* (Lobanov *et al.*, 2012), en Estados Unidos como en Europa se ha establecido que aparte de los roedores, el papel de los cérvidos silvestres como hospedadores es necesario para el ciclo de *A. phagocytophilum* dado que no hay evidencia de la transmisión transovarica en garrapatas Ixodes por lo que los huéspedes vertebrados son necesarios para mantener el ciclo endémico (Tate *et al.*, 2005; Baldrige *et al.*, 2009; Rar y Golovljova, 2011; Jin *et al.*, 2012). Así mismo, el venado cola blanca ha sido considerado un huésped efectivo de *Ehrlichia spp.* basado en la alta prevalencia de anticuerpos de *E. chaffeensis* en venados muestreados en el suroeste de Estados Unidos (Arens *et al.*, 2003).

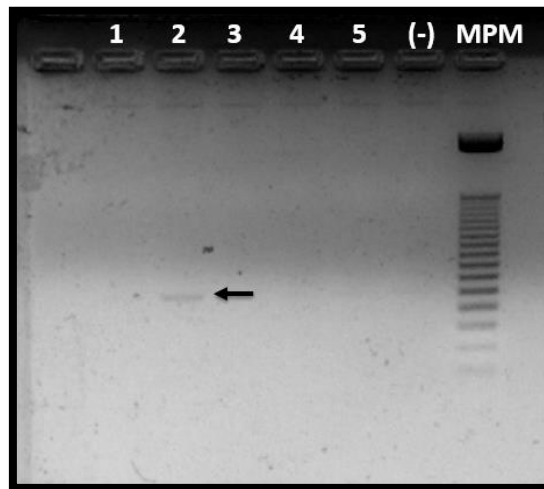


Figura 8. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *A. phagocytophilum* en sangre de venados. La flecha negra muestra el amplicón de 262 pb. MPM Marcador de peso molecular de 50 pares de bases, control negativo. (-).

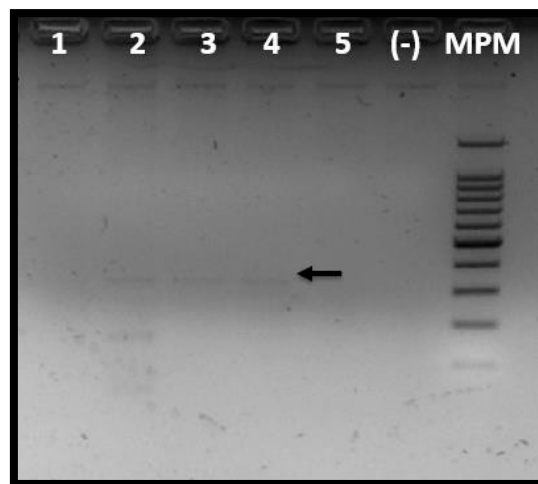


Figura 9. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Ehrlichia spp.* en sangre de venados. La flecha negra muestra el amplicón de 345 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, control negativo. (-).

La transmisión de *A. phagocytophilum* ha sido demostrada en garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* e *I. persulcatus* en el que se incluye *I. scapularis* y recientemente se ha detectado en garrapatas *Dermacentor*, *Hemaphysalis* y *Rhipicephalus* (Ogden *et al.*, 2008; Holden *et al.*, 2009; Woldehiwet, 2010). Mientras que el principal vector de *Ehrlichia spp.* es *A. americanum*, existe registro de otras especies como *D. variabilis*, *I. pacificus*, *I. ricinus*, *A. testudinarium* y *Haemaphysalis yeni* (Lockhart *et al.*, 1997; Paddock y Childs, 2003; Mixson *et al.*, 2006). Esto

concuenda con nuestros resultados ya que tanto el venado cola blanca como el venado bura resultaron positivos en el diagnóstico molecular corroborando la participación de los venados en el ciclo etiológico de *A. phagocytophilum*, y *Ehrlichia spp.* En este estudio la transmisión de estos patógenos en los venados, se puede especular que fue a través de *D. albipictus*, aunque no se descarta que existan otros vectores dentro de los sitios de muestreos como *D. variabilis* y *Rhipicephalus spp.* los cuales están reportadas en la región (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016; Sosa-Gutierrez *et al.*, 2016). Respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio para *Rickettsia spp.* ninguna muestra resultó positiva al no observarse la banda esperada de 401 pares de bases (Figura 10). Esto puede deberse a que dentro de las zonas de muestreo no se encuentra el vector de *Rickettsia spp.* Los principales vectores son las garrapatas: *D. andersoni*, *D. variabilis*, *D. occidentalis* *A. americanum* *A. cajennense* y *Haemaphysalis leporispalustris*, dentro de estas *D. andersoni* y *D. variabilis* han sido reportadas en Chihuahua y se han presentado como garrapatas que no tiene un hospedero específico pudiendo parasitar cualquier tipo de mamífero incluido el venado (Burgdorfer, 1969; Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016). Sin embargo, para detectar rickettsia en una región la muestra en este estudio pudiera ser insuficiente ya que en otras investigaciones como la realizada por Inokuma *et al.* (2008) muestrearon un total de 112 venados en los que ocho resultaron positivos a *rickettsia helvética* en Japón. Son pocos los antecedentes de investigaciones para la detección de este patógeno en venados. Un estudio realizado en Connecticut, Estados Unidos para la detección de anticuerpos de *R. rickettsii* en mamíferos mediante la prueba de micro aglutinación mostro como positivos a 14 de 549 venados cola blanca (Magnarelli *et al.*, 1979). Demma *et al.*, (2006) reportan un brote de *R. rickettsii* en una comunidad rural de Arizona donde especulan que el patógeno pudo haber sido introducido en la región por la inmigración de perros rickettsémicos provenientes de México o por el aumento de venados y alces de Arizona.

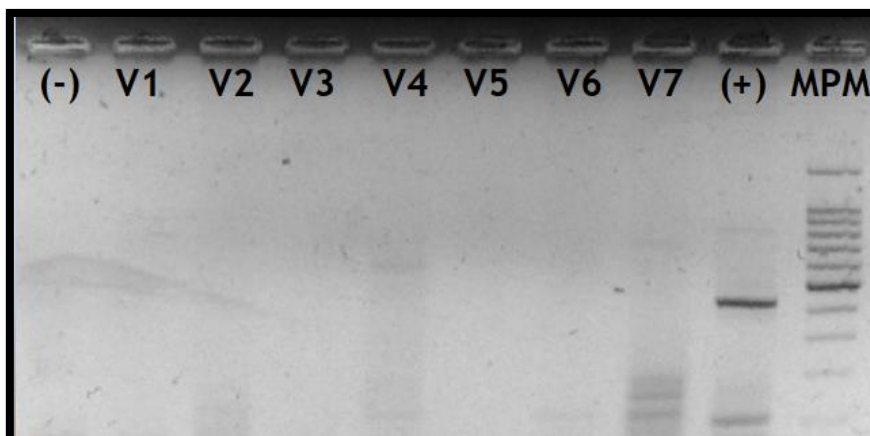


Figura 10. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Rickettsia spp.* en sangre de venados. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, control positivo (+), control negativo (-).

En Chihuahua los venados se manejan cada vez más mediante cercas, suplementación, translocación y cacería (Medrano *et al.*, 2012). De acuerdo a recientes investigaciones en la región se ha incrementado la importancia de la detección de patógenos rickettsiales debido a los riesgos que implica para la salud pública (Castañon-Morales, 2016; Escárcega *et al.*, 2018).

De los ocho venados muestreados, cuatro estaban coinfectados con *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia spp.* Estos fueron recolectados de los municipios de Aldama en donde el 50 % (1/2) de los venados estaba coinfectado, Buenaventura donde el 50 % (2/4) de los venados presentaban infección e Ignacio Zaragoza donde el 100% (1/1) presentaba infección. El municipio de Namiquipa solo presentó 1 venado con *Ehrlichia spp.* sin infección. Este fenómeno también ha sido reportado por Holden *et al.*, (2009) en California, Estados Unidos donde realizaron detección molecular de *B. burgdorferi*, *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* en garrapatas *I. pacificus* en las que estas presentaban infección de *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum*. Otro caso fue el reportado por Lee *et al.* (2009) en Corea del Sur en el que realizó detección molecular de *E. chaffeensis* y *A. bovis* sugiriendo que el venado puede ser un reservorio natural de estos agentes.

En el presente estudio los 14 pools de garrapata analizados para *A. phagocytophilum*, resultaron negativos al no encontrarse la presencia de la banda esperada de 262 pares de bases (Figura 11). De los pools de garrapatas analizadas el 42 % (6/14) resultaron positivos a *Ehrlichia spp.* presentando una banda de 345 pares de bases (Figura 13). Para los pools de *Rickettsia spp.* todos resultaron negativos al no encontrarse la presencia de la banda esperada de 401 pares de bases (Figura 14). Esto se muestra con mayor detalle en el Cuadro 10.

Cuadro 10. **Diagnóstico de patógenos rickettsiales en pools de garrapatas**

Venado ID	Pool ID	<i>Ehrlichia spp.</i>
	P.1.1	+
	P.1.2	-
1	P.1.3	-
	P.2.1	+
2	P.2.2	-
	P.3.1	-
	P.3.2	-
	P.3.3	-
	P.3.4	-
3	P.3.5	+
4	P.4	+
5	P.5	+
7	P.7	-
8	P.8	+

*El símbolo (-) muestra los resultados negativos, el símbolo (+) muestra los resultados positivos

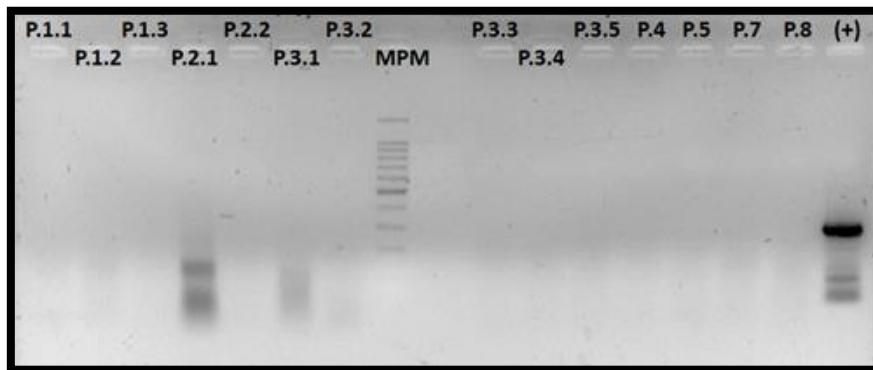


Figura 11. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *A. phagocytophilum* en pools de garrapatas. En ninguna muestra se expresa el amplicón de 262 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, control positivo (+).

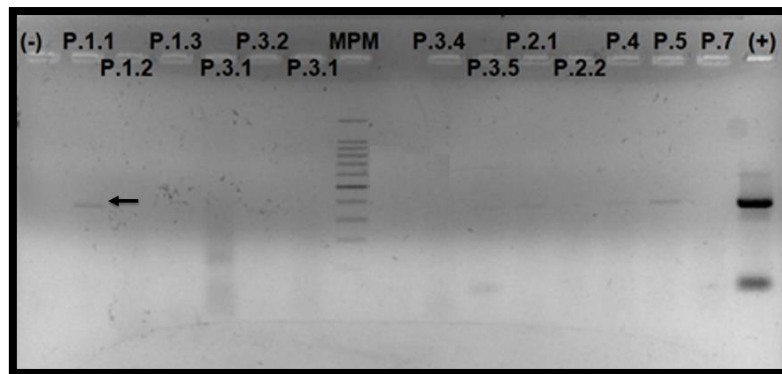


Figura 12. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Ehrlichia spp.* en pools de garrapatas. La flecha negra muestra el amplicón de 262 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, control positivo (+), control negativo (-).

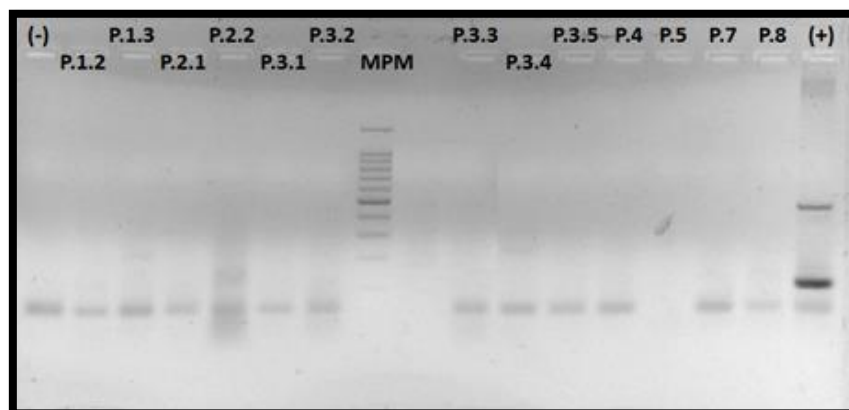


Figura 13. Análisis electroforético de los productos de amplificación del diagnóstico molecular de *Rickettsia spp.* en pools de garrapatas. En ninguna muestra se expresa el

amplificación de 401 pb. MPM Marcador de peso molecular de 100 pares de bases, control negativo (-) control positivo(+).

Dado que *A. phagocytophilum* no fue detectado en los pools de *D. albipictus*, pero si en las muestras de sangre de venado se considera que pudiera existir otro vector de este patógeno como *D. variabilis* y *Rhipicephalus spp.* ya que la distribución de estas tres especies puede localizarse en las mismas áreas del desierto Chihuahuense (Guzmán-Cornejo *et al.*, 2016; Sosa-Gutiérrez *et al.*, 2016). Cabe mencionar que las fechas de muestreo en este estudio coinciden con el periodo donde *D. albipictus* se encuentra parasitando al venado (diciembre-marzo), sin embargo, no coincide con los periodos de fijación de *D. variabilis* y *Rhipicephalus spp.*, el cual ocurre en primavera-verano (abril-agosto dependiendo de la localización) para ambas especies (Burg, 2001; Dantas-Torres, 2010; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Respecto a los resultados positivos de los pools de *D. albipictus* para *Ehrlichia spp.* no se han reportado estudios previos que muestren la asociación patógeno-vector. Stoffel *et al.* (2015) en Missouri, Estados Unidos revelaron en un caso de estudio sobre recolección de *D. albipictus* obtenidas de alces infectados con *E. chaffeensis*, estas garrapatas fueron probadas para la detección de *Ehrlichia spp.* y *E. chaffeensis* por PCR observándose resultados negativos para ambas, por lo que especulan que la infección en los alces puede ocurrir debido a la transmisión por otro vector. *A. americanum* es el principal vector de *E. chaffeensis* y se describe la transmisión del patógeno de manera transestadial y hasta el momento no existen informes en los cuales reporten una transmisión transovárica (Ewing *et al.*, 1995; Paddock y Childs, 2003). Esto ocurre de igual manera con *E. canis* y *R. sanguineus* en los que la transmisión ocurre de manera transestadial (Bremer *et al.*, 2005). Así mismo se ha reportado la infección de *D. variabilis* con *E. chaffeensis* y *E. risticii* en Estados Unidos (Levine *et al.*, 1990; Steiert y Gilfoy, 2002).

Los resultados en los pools para *Rickettsia spp.* concuerdan con los obtenidos en las muestras de sangre de venado en los que también fueron negativas, por lo que se especula que en este caso no existe presencia del patógeno en las regiones muestreadas, sin embargo, ya que las muestras recolectadas no son representativas, no se descarta la posibilidad de que los venados y sus vectores estén libres de *Rickettsia spp.* Los principales vectores de *Rickettsia spp.* son las especies del orden ixodes teniendo reportes de *D. andersoni*, *D. variabilis* y *A. americanum* donde la transmisión ocurre de manera transovárica y transestadial (Mcdade y Newhouse, 1986; Azad y Beard, 1998; Williamson *et al.*, 2010). *Rhipicephalus* es uno de los principales vectores de *Rickettsia rickettsii* la cual ha sido reportada en perros en el norte de México, sin embargo esta garrapata es considerada como una especie peridoméstica (Eremeeva *et al.*, 2011).

7 CONCLUSIONES

Los venados cola blanca y bura de los municipios de Aldama, Namiquipa, Buenaventura e Ignacio Zaragoza están parasitados por garrapatas duras *D. albipictus*, garrapatas blandas *Otobius* y larvas de mosca *Oestrus*. Estos venados son portadores de patógenos rickettsiales por lo que posiblemente estos puedan estar involucrados en el ciclo enzoótico de *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia spp.* Se desconoce como ocurrió la transmisión de *A. phagocytophilum* en los venados bura y cola blanca ya que *D. albipictus*, la única especie de garrapata dura colectada de los venados resulto negativa a este patógeno. La transmisión de *Ehrlichia spp.* en los venados puede ocurrir a través de *D. albipictus* demostrando la participación de ambos en el ciclo enzoótico del patógeno, sin embargo no se descarta la participación de otros ectoparásitos.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Addison, E. M., Johnson, F. J. and Fyvie, A. 1979. Dermacentor albipictus on moose (Alces alces) in Ontario, Journal of wildlife diseases, 15(2), p. 281–284.
- Arens, M. Q., Liddell, A. M. Buening, G., Gaudreault-Keener, M., John W., Comer, J. A., Buller, R. S., Storch, G. A. 2003. Detection of Ehrlichia spp. in the blood of wild white-tailed deer in Missouri by PCR assay and serologic analysis, Journal of Clinical Microbiology, 41(3), p. 1263–1265.
- Arthur, D. R. 1960. Ticks a monograph of the ixodoidea. Euston Road, London: Cambridge University Press.
- Azad, A. F. and Beard, C. B. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod Vectors, Emerging Infectious Diseases, 4(2), p. 179–186.
- Baldrige, G. D., Scoles, Glen. A., Burkhardt, N., Schloeder, B., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. 2009. Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and Anaplasma phagocytophilum variants in Dermacentor albipictus (Acari: Ixodidae), Journal of Medical Entomology, 46(3). p. 625–632.
- Bautista-Piña, C. 2014. Seroepidemiología de cuatro enfermedades infecciosas en cérvidos exóticos en Soto la Marina, Tamaulipas, México. Tesis. Maestría En Ciencia Animal. Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia.
- Beja-Pereira, A., Bricker, B., Chen, S., Almendra, C., White, P. J. Luikart, G. 2009. DNA Genotyping Suggests that Recent Brucellosis Outbreaks in the Greater Yellowstone Area

Originated from Elk, Journal of Wildlife Diseases, 45(4), p. 1174–1177.

- Bengis, R. G., Kock, R. A. and Fischer, J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 21(1), p. 53–65.
- Bishop, F. C. and Wood, H. P. 1913. The biology of some North American ticks of the Genus *Dermaceter*, in *Parasitology*, p. 160–165.
- Bishopp, F. C. and Trembley, H. L. 1945. Distribution and host of certain North American ticks, *The Journal of Parasitology*, 31(1), p. 1–54.
- Bohm, M. W., Piran C., Chambers, J., Lesley Hutchings, M. R. 2007. Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK, *Veterinary Journal*, 174(2), p. 260–276.
- Bremer, W. G., Schaefer, J., Wagner, E., Ewing, S. A., Rikihisa, Y., Needham, G., Jittapalpong, S., Moore, D., Stich, R. 2005. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*, *Veterinary Parasitology*, 131, p. 95–105.
- Burg, J. G. 2001. Seasonal activity and spatial distribution of host-seeking adults of the tick *Dermacentor variabilis*, *Medical and Veterinary Entomology*, 15, p. 413–421.
- Burgdorfer, W. 1969. Ecology of tick vectors of American spotted fever, *Bulletin of the World Health Organization*, 40(3), p. 375–381.
- Cantú-Martínez, M. A. Silva-Páez, M. L. Avalos-Ramírez, R. Wong-Gonzalez, A. Salinas-Meléndez, J. A. Segura Correa, J. C. 2008. Prevalence of antibodies against *Anaplasma marginale* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) in hunting farms of Northeastern Mexico, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(11), p. 1495–1498.
- Cantú, A. Ortega-S, J. Mosqueda, A., Garcia-Vazquez, J., Henke, Z., Scott E. George, J. E. 2008. Prevalence of infectious agents in free-ranging white-tailed deer in northeastern Mexico, *Journal of Wildlife Diseases*, 44(4).
- Carrillo Magaña, F. A. 2013. Ciclo de desarrollo de las astas del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus yucatenensis*) en condiciones de cautiverio. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, p. 20-30.
- Castañon-Morales, A. I. 2016. Prevalencia de *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia spp.* detectados por PCR en garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) y en

- caninos de Ciudad Juárez, Chihuahua. Tesis. Maestría En Ciencias Veterinarias Sustentables Departamento De Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma De Ciudad Juárez.
- Chen, S. M., Dumler, J. S., Bakken, J. S. and Walker, D. H. 1994. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32:589–595.
- Chomel, B. B., Carniciu, M. L., Kasten, R. W., Castelli, P. M., Work, T. M., Jessup, D. A. 1994. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*), *Journal of Wildlife Diseases.*, 30(1).
- Colodner, C. A. 2001. Evaluación del Estado de Salud de la Población de Borrego Cimarrón (*Ovis canedensis cremnobates* Elliot, 1903) en la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México
- Contreras, J., Mellink, E., Martínez, R, Medina, G. 2007. Parásitos y enfermedades del venado bura (*Odocoileus hemionus fuliginatus*) en la parte norte de la sierra San Pedro Mártir, Baja California, México, *Revista Mexicana de Mastozoología*, 11, p. 8–20.
- Cooley R. A. 1938. The genera *Dermacentor* and *Otocentor* (Ixodidae) in the United States, with studies in variation. *Natl. Inst. Health Bullxx*; 171, p. 1–89.
- Cortinas, M. R. and Kitron, U. 2006. County-level surveillance of white-tailed deer infestation by *Ixodes scapularis* and *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae) along the Illinois river, *Journal of medical entomology*, 43(5), p. 810–819.
- Crocquet-Valdes, P. A. Díaz-Montero, C.M. Feng, H. M. Li, H. Barrett, A. Walker, D. H. 2002. Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis, *Vaccine*, 20, p. 979–988.
- Crosbie, P. R., Boyce, W. M. and Rodwell, T. C. 1998. DNA Sequence Variation in *Dermacentor hunteri* and Estimated Phylogenies of *Dermacentor spp.* (Acari: Ixodidae) in the New World, *Journal of Medical Entomology*, 35(3), p. 277–288.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, *Parasites & Vectors*, 3(26), p. 1–11.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. and Hyatt, A. D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-

threats to biodiversity and human health, *Science*, 287.

- Demma, L. J. et al. 2006. Serologic evidence for exposure to rickettsia rickettsii in eastern Arizona and recent emergence of Rocky mountain spotted fever in this region, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 6(4), p. 423–429.
- Dergousoff, S. J. and Chilton, N. B. 2007. Differentiation of three species of ixodid tick, *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* and *D. albipictus*, by PCR-based approaches using markers in ribosomal DNA', *Molecular and Cellular Probes*, 21, p. 343–348.
- Drew, M. L. and Samuel, W. M. 1985. Factors affecting transmission of larval winter ticks, *dermacentor albipictus* (Packard), to moose, *Alces alces* L., in Alberta, Canada, *Journal of Wildlife Diseases*, 21(3), p. 274–282.
- Dumler, J. S. et al. 2001. Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*, *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2001), p. 2145–2165.
- Durden, L. A. Luckhart, S., Mullen, G. R., Smith, S. 1991. Tick Infestations of white-tailed deer in Alabama, *Journal of Wildlife Diseases*, 27(4), p. 606–614.
- Edridge, B. F. and Edman, J. D. 2000. *Medical Entomology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Eremeeva, M. E. 2011. Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus Ticks, Mexicali, Mexico', *Journal of Medical Entomology*, 48(2), p. 418–421.
- Ernst, S. E. and Gladney, W. J. 1974. *Dermacentor albipictus*: hybridization of the two forms of the winter tick, *Annals of the Entomological Society of America*, 68(1), p. 63–67.
- Escárcega Ávila, A. M. Luna Flores, B. S., de la Mora Covarrubias, A., Jiménez Vega, F. 2018. Análisis exploratorio de enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas en perros de Ciudad Juárez, Chihuahua, México, *Acta Universitaria*, 28(3), p. 1–14.
- Ewing, S. A. 1995. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) a white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae), *Journal of Medical Entomology*, 32(3), p. 368–374.

- Fang, R., Blanton, L. S. and Walker, D. H. 2017. Rickettsiae as Emerging Infectious Agents Rong, Clinics in Laboratory Medicine. Elsevier Inc, 37(2), p. 383–400.
- Fenollar F, Fournier P, Raoult D. 2007. Diagnostic strategy of rickettsioses and ehrlichioses. In: Raoult D, Parola P, editors. Rickettsial Diseases. New York: Informa Healthcare;315–330
- Foley, J. E., Hasty, J. M. and Lane, R. S. 2015. Diversity of rickettsial pathogens in Columbian black-tailed deer and their associated keds (Diptera: Hippoboscidae) and ticks (Acari : Ixodidae), Journal of Vector Ecology, 41(1), p. 41–47.
- Fournier, P.-E. and Raoult, D. 2007. Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of Rickettsia, in Raoult, D. and Parola, P. (eds) Rickettsial Diseases. New York: Informa healthcare, p. 399.
- Fulbright T. y Ortega A. 2007. Ecología y manejo de venado cola blanca. Texas A&M University, Uvalde, Texas. USA. p. 266.
- Furman, D. P. and Loomis, E. C. 1984. Ticks of California (Acari: Ixodida), BUulletin of the California insrct survey.
- Galli, L., Pereira, A., Márquez, A., Mazzoni, R. 2006. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America, Aquaculture, 257(1–4), p. 78–82.
- Gallina Tessaro, S. 2011. El Venado Bura Del Desierto Chihuahuense. 6° Simposio sobre Fauna Cinegética de México, p. 13.
- Gallina-Tessaro, S., Hernández-Huerta, A., Delfín-Alfonso, C. A., González-Gallina, A. 2009. Unidades para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre en México (UMA). Retos para su correcto funcionamiento, Investigación ambiental, 1(2), p. 143–152.
- Galindo-Leal, C. y Weber, M. 1998.El venado de la Sierra Madre Occidental. Ecología, manejo y conservación. EDICUSA-CONABIO. Primera edición. p. 272.
- Garza-Barraza, E. 2013. Detección serológica de patógenos multi-especie en venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en tres microrregiones del noreste de México. Tesis de Licenciatura. Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia Y Facultad De Agronomía. Universidad Autónoma De Nuevo León. México.

- Geist, V. 1998. Deer of the World, their evolution, behavior and ecology, *The Journal of Wildlife Management*, 64(2), p. 326.
- Gortázar, C., Herrero, J., Villafuerte, R., Marco, J. 2000. Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain, *Mammalia*, 64(4).
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J. 2006. Disease risks and overabundance of game species, *European Journal of Wildlife Research*, 52(2), p. 81–87.
- Green, M. R. and Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Zool. Res.
- Gribble D. H. 1969. Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 155:462–469.
- Guerra, M. 2002. Predicting the Risk of Lyme Disease: Habitat Suitability for *Ixodes scapularis* in the North Central United States, *Emerging Infectious Diseases*, 8(3), p. 289–297.
- Guglielmone, A. A. and Nava, S. 2014. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names with notes on confusions and misidentifications.
- Guzmán-Cornejo, C. et al. 2016. The Dermacentor (Acari, Ixodida, ixodidae) of Mexico: Hosts, geographical distribution and new records, *ZooKeys*, (569), p. 1–22.
- Guzmán, M., Kourí, G. and Pelegrino, J. 2001. Enfermedades virales emergentes, *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 53(1), p. 5–15.
- Hamer, S. A. et al. 2012. Wild birds and urban ecology of ticks and tick-borne pathogens, Chicago, Illinois, USA, 2005-2010, *Emerging Infectious Diseases*, 18(10), p. 1589–1595.
- Hall, E. R. 1981. *The Mammals of North America*. 2a ed. John Wiley and Sons, New York, 2601-1181.
- Hellgren, O., Waldenström, J. and Bensch, S. 2004. A New PCR Assay for Simultaneous Studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus From Avian Blood, *Journal of Parasitology*, 90(4), p. 797–802.
- Holden, K., Boothby, J. T., Anand, S. M., Robert F. 2009. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks (Acari: Ixodidae) from a Coastal region of California, *Journal of Medical Entomology*, 40(4), p. 534–539.
- Hoskins, J. D. 1991. Ixodid and argasid ticks keys to their identification. *The Veterinary clinics of North America: Small animal practice*. Elsevier, 21(1), p. 185–197.

- Hudson, P. 2002. *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford
- Ivanova, L. B. et al. 2013. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere, *Environmental Microbiology*, 16(4), p. 1069–1080.
- Jin, H. Wei, Feng Liu, Quan Qian, Junet. 2012. Epidemiology and Control of Human Granulocytic Anaplasmosis: A Systematic Review, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(4), p. 269–274.
- Jones, B. A. et al. 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), p. 8399–8404.
- Katavolos, P. et al. 1998. Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Granulocytic Ehrlichiosis, *Journal of Infectious Diseases*, 177(5), p. 1422–1425.
- Kawahara, M. et al. 2006. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), p. 1102–1109.
- Kollars, T. M. Oliver, J. H Jr., Masters, E. J., Kollars, P. G., Durden, L. A. 2000. Host utilization and seasonal occurrence of *Dermacentor* species (Acari: Ixodidae) in Missouri, USA, *Experimental and Applied Acarology*, 24, p. 631–632.
- Lederberg, J., Shope, R. E. and Oakes, S. C. 2015. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. *Emerging Microbial Threats to Health*, Division of Health Sciences Policy, Division of International Health, Institute of Medicine. , Washington, DC, National Academy Press.
- Lee, M. et al. 2009. Natural co-infection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis* in a deer in South Korea, *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(1), p. 101–103.
- Leo, S. T. Samuel, W. M., Pybus, M. J., Sperling, F. A. 2014. Origin of *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae) on Elk in the Yukon, Canada, *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), p. 544–551.
- Leo, S. S. T., Pybus, M. J. and Sperling, F. A. 2010. Deep Mitochondrial DNA Lineage Divergences Within Alberta Populations of *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae) Do Not Indicate Distinct Species, (1998), p. 565–574.

- Leopold, A.S. 1959. Fauna silvestre de México. Editorial Pax, México. p. 600
- Levine, J. F. Levy, Michael G., Nicholson, William L., Gager, Robin B. 1990. Attempted Ehrlichia risticii transmission with Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae), Journal of Medical Entomology, 27(5), p. 931–933.
- Lindahl, J. and Grace, D. 2015. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review, Infection Ecology & Epidemiology, (5), p. 11.
- Lobanov, V. A. Gajadhar, A. A., Al-Adhami, B., Schwantje, H. M. 2012. Molecular Study of Free-ranging Mule Deer and White-tailed Deer from British Columbia, Canada, for Evidence of Anaplasma spp. and Ehrlichia spp, Transboundary and Emerging Diseases, 59(3), p. 233–243.
- Lockhart, J. M. Davidson, W. R., Stallknecht, D. E., Dawson, J. E., Little, S. E. 1997. Natural History of Ehrlichia chaffeensis (Rickettsiales: Ehrlichieae) in the Piedmont physiographic province of Georgia, The Journal of Parasitology, 83(5), p. 887.
- McCabe, R. E. y R. T. McCabe. 1984. Of slings and arrows: an historical retrospection. p. 19-72. En: Halls L. K. (ed.). White tailed deer: Ecology and Management. Stackpole Books, Harrisburg, Pennsylvania. p. 870.
- Magnarelli, L. A., Anderson, J. F. and Burgdorfer, W. 1979. Rocky mountain spotted fever in connecticut: human cases, spotted-fever group rickettsiae in ticks, and antibodies in mammals, American Journal of Epidemiology, 110(2), p. 148–155.
- Mandujano, S., y V. Rico-Gray. 1991. Hunting, use, and knowledge of the biology of the white-tailed deer (Odocoileus virginianus hays) by the maya of central Yucatan, Mexico. Journal of Ethnobiology 11:175-183.
- Marcondes, C. B. 2011. Entomologia médica e veterinária. 2a edição. São Paulo: Editora Atheneu.
- Martinez, A. Salinas, A., Martinez, F., Cantu, A., Miller, D K. 1999. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. Journal of wildlife diseases, 35(4), p. 799–803.
- McCabe, R. E. y R. T. McCabe. 1984. Of slings and arrows: an historical retrospection. Pp. 19-72. En: Halls L. K. (ed.). White tailed deer: Ecology and Management. Stackpole Books, Harrisburg, Pennsylvania. p.870.

- Mcdade, J. E. and Newhouse, V. F. 1986. Natural history of *Rickettsia rickettsii*, *Annual Rev. Microbiology*, 40, p. 287–309.
- 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, *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), p. 1372–1374.
- Mixson, T. R. Campbell, Scott R., Gill, James S., Ginsberg, Howard S., Reichard, Mason V., Schulze, Terry L., Dasch, Gregory. 2006. Prevalence of Ehrlichia, Borrelia, and Rickettsial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from nine states., *Journal of medical entomology*, 43(6), p. 1261–1268.
- Mueller-Anneling, L., Gilchrist, M. J. and Thorne, P. S. 2000. Ehrlichia chaffeensis antibodies in white-tailed deer, Iowa, 1994 and 1996, *Emerging Infectious Diseases*, 6(4), p. 397–400.
- Mukul-Yerves, J. M. Zapata-Escobedo, M., Montes-Pérez, R. C., Rodríguez-Vivas, R. I., Torres-Acosta, J. F. 2014. Parásitos gastrointestinales y ectoparásitos de ungulados silvestres en condiciones de vida libre y cautiverio en el trópico mexicano, *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 5(4), p. 459–469.
- Murphy, G. L. Ewing, S. A., Whitworth, L. C., Fox, J. Carl, Kocan, A. Alan. 1998. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma', *Veterinary Parasitology*, 79(4), p. 325–339
- Nava, S., Vanzal, J. M., González-Acuña, D., Martins, Thiago F., Guglielmo, A. A. 2017. Ticks of the Southern Cone of America.
- Nicholson, W., Sonenshine, D. E., Lane, R. S., Uilenberg, G. 2002. *Medical and Veterinary Entomology*. 1st Editio. Edited by G. Mullen and L. Durden. Statesboro, USA: Academic Press.
- Nowak R. M. 1991. *Walker's mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA.
- Ogden, N. H., Bown, K., Horrocks, B. K., Woldehiwet, Z., Bennett, M. 1998. Granulocytic Ehrlichia infection in Ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K', *Medical and Veterinary Entomology*, 12(4), p. 423–429.
- Ogden, N. H. Lindsay, L. R., Hanincová, K., Barker, I. K., Bigras-Poulin, M., Charron, D. F., Heagy, A., Francis, C. M., O'Callaghan, C. J., Schwartz, I., Thompson, R. A. 2008. Role

- of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, p. 1780–1790.
- Ojeda-chi, M. M. Rodríguez-Vivas, R., Esteve-Gasent, M., Pérez, A., Modarelli, J. J., Villegas-Perez, S. 2018. Ticks and tick-borne diseases molecular detection of rickettsial tick-borne agents in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus yucatanensis*), mazama deer (*Mazama temama*), and the ticks they host in Yucatan, Mexico, *Ticks and Tick-borne Diseases*. Elsevier, 10(2), p. 365–370.
- Oteo, J. A. and Brouqui, P. 2005. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(6), p. 375–380.
- Paddock, C. D. and Childs, J. E. 2003. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), p. 37–64.
- Páez Díaz, R. and Villa Arteta, L. C. 2017. Identificación de larvas productoras de miasis obtenidas del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca con importancia en salud pública, *Nova*, 15(27), p. 119–129.
- Palmer, M., Cox, R. J., Waters, W. R., Thacker, T. C., Whipple, D. L. 2017. Using white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in infectious disease research, *Journal of the American Association*, 56(4), p. 1–11.
- Parola, P., Paddock, C. D., Raoult, D. 2005. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts, *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4).
- Patrick, C. D. and Hair, J. A. 1975. Ecological observations on *Dermacentor albipictus* (Packard) in Eastern Oklahoma. (Acarina: Ixodidae), *Journal of Medical Entomology*, 12(3), p. 393–394.
- Pérez-Gil S. R. 1995 *Importancia económica de los vertebrados silvestres de México*, Conabio PG7 Consultores. S. C. México, D. F.
- Pérez, T. M. Guzmán-cornejo Carmen, Montiel-parra Griselda, Paredes-león Ricardo, Rivas, Gerardo. 2014. Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, p. 399–407.

- Popov, V. L. Han, Violet C., Chen, S. M., Dumler, J. S., Feng, H. M., Andreadis, T. G., Tesh, R. Walker, D. H. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*, *Journal of Medical Microbiology*, 47(3), p. 235–251
- Pruvot, M., Kutz, S., Van Der Meer, F., Marco Barkema, H. W., Orsel, K. 2014. Pathogens at the livestock-wildlife interface in Western Alberta: Does transmission route matter?, *Veterinary Research*. *Veterinary Research*, 45(1), p. 1–12.
- Ramos, C. F. 2013. Detección serológica de patógenos multi-especie en venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en tres microrregiones del noreste de México. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rar, V. and Golovljova, I. 2011. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 11, p. 1842–1861.
- Rolfs, A. I., Schuller, U. Finckh, and I. Weber-Rolfs. 1992. PCR: clinical diagnostics and research. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, A., Ojeda-Chi, M., Pérez-Cogollo, L., Trinidad-Martínez, I., Bolio-González, M. 2014. Integrated control of ticks in bovine livestock, *Ecosistemas y recursos pecuarios*, 1(3), p. 295–308.
- Roug, A. S., Torres, P., Jones S., Johnson, K., Christine K. 2012. Serosurveillance for livestock pathogens in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), *PLoS ONE*, 7(11), p. 1–10.
- Sayler, K. A. *et al.* 2016. Vector-borne diseases, surveillance, prevention prevalence of tick-borne pathogens in host-seeking *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) and *Odocoileus virginianus* (Artiodactyla: Cervidae) in Florida, *Journal of Medical Entomology*, 53(4), p. 949–956.
- Sambrook, J. & Russell D. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3a Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SEMARNAT. 2010. Permisos de caza deportiva expedidos e ingresos adquiridos en las temporadas cinegéticas 1999 – 2000. http://aplicaciones.semarnat.gob.mx/estadisticas/compendio2010/10.100.13.5_8080/ibi_apps/WFServlet34fa.html
- SEMARNAT. 2000. Aprovechamiento de la vida silvestre. http://www.paot.org.mx/centro/in-semarnat/informe02/estadisticas_2000/informe_2000/07_Aprovechamiento/7.2_Manejo

- Siembieda, J. L. Kock, R. A. Mccracken, T. A. Newman, S. H. 2011. The role of wildlife in transboundary animal diseases, *Animal Health Research Reviews*. 12(1). p. 95–111
- Smith, W. P. 1991. *Odocoileus virginianus*. *Mammalian Species* 388: 1-13
- Sonenshine, D. E. and Roe, R. M. 2014. *Biology of ticks volume 1*. Second edi. Edited by D. E. Sonenshine and R. M. Roe. New York: Oxford University Press.
- Sosa-Gutierrez, C. G., Vargas-Sandoval, M., Torres, J., Gordillo-Pérez, G. 2016. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in México, *Journal of veterinary science*, 17(3), p. 353–360.
- Steiert, J. G. and Gilfoy, F. 2002 Infection rates of *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* by *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in southwest Missouri, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2(2), p. 53–60.
- Stoffel, R. T., Johnson, G. C., Boughan, K., Ewing S. A. Stich, R. W. 2015. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in a naturally infected elk (*Cervus elaphus*) from Missouri, USA, *JMM Case Reports*.
- Sukumaran, B., Narasimhan, S., Anderson, J. F., DePonte, K., Marcantonio, N., Krishnan, M. N. Fish, D., Telford, S. R., Kantor, F. S., Fikrig, E.. 2006. An *Ixodes scapularis* protein required for survival of *Anaplasma phagocytophilum* in tick salivary glands, *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), p. 1507–1517
- Szabó, M. P., Castro, M. B., Ramos, H., Garcia, M. V., Castagnolli, K. C., Pinter, A., Veronez, V. A., Magalhães, G. M., Duarte, J., Labruna, M. B. 2007. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil, *Veterinary Parasitology*, 143(2), p. 147–154.
- Tate, C. M. Mead, Daniel G. Luttrell, M Page Howerth, Elizabeth W. Dugan, Vivien G. Munderloh, Ulrike Davidson, William R. 2005. Experimental infection of white-tailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), p. 3595–3601.
- Torres-Mejía, A. M. y De la Fuente, J. 2006. Risks Associated With Ectoparasites of Wild Mammals in the Department of Quindío, Colombia, *International Journal of Applied*

- Resource Veterinarian Med, 4, p. 187–192.
- des Vignes, F. Piesman, J. Heffernan, R. Schulze, T. L. Stafford, K. Fish, D. 2001. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(5), p. 773–778.
- Villarreal, E. O., Villarreal, G. J., Viejo, G. J., Reséndiz, M. R. 2014. Nuevas categorías de trodeos de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) del Safari Club Internacional, para Mexico. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 6(2), p. 382–388.
- Walker D. H, Dumler J. S. 1997. Human monocytic ehrlichiosis and granulocytic ehrlichiosis. *Arch Pathol Lab Med*; 121:785-91.
- Wells, E. A. d'Alessandro, A., Morales, G. A. Angel, D. 1981. Mammalian wildlife diseases as hazards to man and livestock in an area of the Llanos Orientales of Colombia. *Journal of Wildlife Diseases*. 17(1), p. 153–162.
- Wilkinson, P. R. 1967. The distribution of Dermacentor ticks in Canada in relation to bioclimatic zones, *Canadian Journal of Zoology*, 45(4), p. 517–537.
- Williamson, P. C., Billingsley, P. M., Teltow, G. J., Seals, J. P., Turnbough, M. A., Atkinson, S. F. 2010. *Borrelia*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* spp. in ticks removed from persons, Texas, USA, *Emerg Infect Dis*, 16(3), p. 441–446.
- Wimberly, M. C., Baer, A. D. and Yabsley, M. J. 2008. Enhanced spatial models for predicting the geographic distributions of tick-borne pathogens, *International Journal of Health Geographics*, 7(1), p. 15.
- Woldehiwet, Z. 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*, *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), p. 108–122.
- Wolf, K. N., De Perno, C. S., Jenks, J. A., Stoskopf, M. K., Kennedy-Stoskopf, S., Swanson, C. C., Brinkman, T. J., Osborn, R. G., Tardiff, J. A. 2008. Selenium Status and Antibodies to Selected Pathogens in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) in Southern Minnesota, *Journal of Wildlife Diseases*, 44(1), p. 181–187.
- Yabsley, M. J., Loftis, A. D. and Little, S. E. 2008. Natural and experimental infection of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from the United States with an *Ehrlichia* sp. closely related to *Ehrlichia ruminantium*. *Journal of wildlife diseases*, 44(2), p. 381–7.
- Yunker, C. E., Keirans, J. E., Clifford, C. M., and Easton, E. R. 1986. Dermacentor ticks (Acari:

Ixodoidea: Ixodidae) of the New World: a scanning electron microscope atlas. Proc. Entomol. Soc. Wash. 88: 609-627.