

Rickettsia spp. en garrapatas (Acari: Ixodidae) que infestan perros de una comunidad rural con antecedentes de rickettsiosis, Yucatán, México

Daly Martínez-Ortiz¹, Marco Torres-Castro², Karina López-Ávila², Edgar Koyoc-Cardena³, Pablo Manrique-Saide^{3,4}

1. Servicios de Salud de Yucatán, Mérida, México. 2. Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), Mérida, México. 3. Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UADY. 4. Departamento de Zoología, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, UADY.

ABSTRACT

Rickettsia spp. in ticks (Acari: Ixodidae) infesting dogs from a rural community with rickettsial diseases reports, Yucatan, Mexico.

Introduction. Bacteria of the *Rickettsia* genus are causal agents of the rickettsial diseases, zoonoses transmitted by ectoparasites. In Yucatan, in inhabitants from Bolmay an outbreak occurred; however, the probable vector was not identified.

Objective. To analyze the *Rickettsia* spp. presence in ticks infesting domestic dogs from Bolmay.

Material and methods. We used 105 vials with up to eight ticks. Total DNA from the ectoparasites was extracted, after the identification of the life stages, sex, gender, and species. Two PCR to isolate fragments of the *htrA* (17-kDa) and *rOmpB* genes belonging to *Rickettsia* spp., were performed. The positive products were sequenced and analyzed using the BLAST tool and the Megablast algorithm.

Results. 291 ticks of the genera *Amblyomma* (55.7%, 162/291), *Rhipicephalus* (34%, 99/291), and *Ixodes* (10.3%, 30/291), and the species *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Ixodes affinis*, and *Amblyomma mixtum*, were used. The PCR positivity was 11.4% (12/105) for the genera *Amblyomma* (66.7%, 8/12), *Rhipicephalus* (25%, 3/12), and *Ixodes* (8.3%, 1/12), and the species *A. mixtum*, *Rh. sanguineus s. l.*, and *I. affinis*. Rickettsial DNA in nymph, larva, adult, males, and females, were identified. Each BLAST analysis showed an identity and coverage of 96% with several *Rickettsia* spp. sequences, such as *Rickettsia typhi*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia prowazekii*, so it was not possible to determine the infecting species.

Historial del artículo

Recibido: 21 sep 2018

Aceptado: 3 dic 2018

Disponible online: 1 may 2019

Palabras clave

Rickettsia spp., rickettsiosis, garrapatas, Yucatán, México.

Keywords

Rickettsia spp., rickettsiosis, ticks, Yucatan, Mexico.

Copyright © 2019 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

Marco Torres Castro, Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán

correo electrónico: antonio.torres@correo.uady.mx
<http://revistabiomedica.mx>.

Conclusion. Ticks infesting dogs from Bolmay are probably involved in the transmission cycle of *Rickettsia* spp. The first molecular evidence of *Rickettsia* spp. in *I. affinis* ticks from Yucatan, Mexico, is presented.

RESUMEN

Introducción. Las bacterias del género *Rickettsia* son agentes causales de las rickettsiosis, enfermedades zoonóticas transmitidas por ectoparásitos. En Yucatán, ocurrió un brote en habitantes de Bolmay, Valladolid; sin embargo, no se identificó el probable artrópodo vector.

Objetivo. Analizar la presencia de *Rickettsia* spp. en garrapatas que infestan perros domésticos de Bolmay.

Material y métodos. Se trabajaron 105 viales con hasta ocho garrapatas. Se extrajo ADN de los ectoparásitos, posterior a la identificación del estadio de desarrollo vital, sexo, género y especie. Se realizaron dos PCR para aislar fragmentos de los genes *htrA* (17-kDa) y *rOmpB*, pertenecientes a *Rickettsia* spp. Los productos positivos fueron secuenciados y analizados con la herramienta BLAST y el algoritmo Megablast.

Resultados. Se utilizaron 291 garrapatas de los géneros *Amblyomma* (55.7%, 162/291), *Rhipicephalus* (34%, 99/291) e *Ixodes* (10.3%, 30/291), y las especies *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Ixodes affinis* y *Amblyomma mixtum*. La positividad por PCR fue de 11.4% (12/105) para los géneros *Amblyomma* (66.7%, 8/12), *Rhipicephalus* (25%, 3/12) e *Ixodes* (8.3%, 1/12), y las especies *A. mixtum*, *Rh. sanguineus s. l.* e *I. affinis*. Se identificó ADN rickettsial en ninfas, larvas, adultos, machos y hembras. Cada análisis BLAST arrojó un 96% de cobertura e identidad con varias secuencias de *Rickettsia* spp. como *Rickettsia typhi*, *Rickettsia felis* y *Rickettsia prowazekii*, por lo que no fue posible determinar la especie infectante.

Conclusión. Las garrapatas que infestan perros de Bolmay, probablemente están involucrados en el ciclo de transmisión de *Rickettsia* spp. Se presenta la primera evidencia molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas *I. affinis* de Yucatán, México.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son consideradas entre los vectores más importantes de agentes patógenos que afectan tanto a seres humanos como a animales. En comparación con otros artrópodos, estos ectoparásitos son capaces de transmitir virus, bacterias y protozoarios, siendo además los

principales reservorios naturales de varios de ellos (1). De todas las enfermedades que transmiten, las más relevantes son las fiebres rickettsiales o rickettsiosis, infecciones sistémicas de compromiso prominente del endotelio vascular que producen gravedad variable, algunas potencialmente fatales como el tifus murino o epidémico y la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (2).

Las rickettsiosis son ocasionadas por bacterias cocobacilos, gram negativos de asociación obligada con las células eucariotas, pertenecientes al género *Rickettsia*, orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae (3). Estos microorganismos no se transmiten directamente entre humanos, por lo que la infección en vertebrados susceptibles ocurre por la inoculación de secreciones glandulares salivales o la autoinoculación de las heces de los ectoparásitos vectores, depositadas sobre la piel o pelaje de los hospederos (4).

Con respecto a las diferencias serológicas, epidemiológicas y características de crecimiento intracelular, el género *Rickettsia* se divide en: 1) grupo de la fiebre manchada, en el cual se encuentran *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii* y *Rickettsia peacockii*, entre otras especies; 2) grupo tifo, conformado por *Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowazekii*; 3) grupo transicional, formado por *Rickettsia felis* y *Rickettsia akari*; y 4) grupo ancestral, que incluye a *Rickettsia canadensis* y *Rickettsia bellii* (2).

En México, particularmente en la Península de Yucatán, se han registrado numerosos casos de fiebres rickettsiales en seres humanos ocasionados por distintas especies: Zavala-Castro *et al.* (5, 6), hallaron tifo murino provocado por *R. typhi*. Asimismo, Zavala-Velázquez *et al.* (7) y Zavala-Castro *et al.* (8), reportaron la infección con *R. felis*. Además, Zavala-Castro *et al.* (9, 10) y Lugo-Caballero *et al.* (11), describieron infecciones con *R. rickettsii*. Finalmente, Zavala-Castro *et al.* (12), notificaron un par de casos originados por *R. akari*. Aunque todas estas rickettsias son transmitidas por ectoparásitos artrópodos, en México y particularmente en la península de Yucatán, son escasas las investigaciones que determinan su posible participación en el ciclo de transmisión (13).

En mayo y junio de 2010, se presentó un brote de fiebre rickettsial en habitantes de la comunidad rural y vulnerable de Bolmay, Yucatán, México (Área de Epidemiología de la Jurisdicción Sanitaria número 2 de los Servicios de Salud de Yucatán [SSY], datos no publicados). Adicionalmente, Martínez-Ortiz *et al.* (14), identificaron (con pruebas moleculares) la infección con *R. typhi* en sangre de perros domésticos de dicha comunidad; sin embargo, no se determinó la circulación de *Rickettsia* spp. en los artrópodos presentes en esta.

El objetivo del presente estudio es analizar la presencia de *Rickettsia* spp. en garrapatas que infestan perros domésticos de Bolmay.

MATERIAL Y MÉTODOS

Bolmay, Yucatán, México (20°32'56"N -87°56'04"W), tiene un clima tipo Aw0 (cálido subhúmedo con lluvias en verano) y una temperatura media anual de 36 °C. La vegetación dominante es selva baja caducifolia con algunas áreas de pasto forrajero y distintos árboles frutales u ornamentales. El uso de suelo es principalmente para actividades agropecuarias y secundariamente para asentamientos urbanos. Además, es común observar numerosos perros y gatos sin dueño, así como diversos grados de pobreza, abundantes desperdicios orgánicos e inorgánicos, carencia de medidas de higiene y de servicios básicos como energía eléctrica, alumbrado público y agua potable (14).

La recolección de ectoparásitos se realizó en los meses de mayo y junio de 2014. La manipulación de los perros fue realizada por médicos veterinarios con el consentimiento y en presencia de los dueños, bajo condiciones mínimas de estrés y siguiendo especificaciones nacionales (NOM-062-ZOO-1999). La inspección duró entre 10 y 15 minutos por animal.

Las garrapatas se recolectaron de 95 perros, seleccionados por conveniencia, en la localidad de estudio, con ayuda de peines para separar el pelo y pinzas de disección para conservar íntegro el hipostoma, según la metodología expuesta por Solís-Hernández *et al.* (15).

Los ejemplares recolectados fueron colocados y embebidos en alcohol absoluto en viales

para microcentrífuga de 1.5 ml (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania) para su conservación y traslado a la Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos (UCBE) del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA)-Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) para el registro del estadio de desarrollo vital (ninfa, larva o adulto), sexo (macho o hembra), género y especie.

Cada ectoparásito se identificó con las guías taxonómicas para ectoparásitos reportados en México y América (16-19), con ayuda de un estereoscopio convencional (Motic®, Columbia Británica, Canadá).

Las garrapatas fueron agrupadas en viales con hasta ocho ejemplares extraídos del mismo perro, pertenecientes a la misma especie y estadio de desarrollo vital. Desafortunadamente, debido a la alta infestación y el tiempo limitado para la exploración de los perros, no fue posible recolectar las pulgas observadas.

De cada uno de los viales se extrajo ADN total (utilizando el ectoparásito entero) con el estuche comercial DNA Mini-Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), según las especificaciones del fabricante. La extracción final se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop2000®; Thermo Scientific™, Maryland, Estados Unidos) y posteriormente se conservó a -20 °C hasta su empleo en las pruebas PCR.

Para la identificación de ADN rickettsial se realizaron dos PCR. La primera de ellas se ejecutó para amplificar un segmento del gen *htrA* antigénico (17-kDa), altamente conservado en todas las especies de *Rickettsia* (20). Para esta reacción se utilizaron los cebadores propuestos por Webb *et al.* (21): 17kD1 (5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3') y 17kD2 (5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3'), que amplifican un tamaño de 434 pb. Posteriormente, con la finalidad de aumentar la sensibilidad, se emplearon los cebadores descritos por Schrieffer *et al.* (22): 17kN1 (5'-CATTACTTGTTCTCAATTCGGT-3') y 17kN2 (5'-GTTTTATTAGTGGTTACGTAA-3'), que codifican una región inmersa en el mismo fragmento con un tamaño de 232 pb.

Adicionalmente, se llevó a cabo una PCR de punto final para identificar un fragmento del gen *rOmpB*

perteneciente al género *Rickettsia* (23). En esta reacción se usaron los oligonucleótidos propuestos por Peniche-Lara *et al.* (24): Rp.330(2) (5'-ATGGCTT CAAAA ACCAAATTTTCTAA-3') y Rp. 330(2) (5'-GCTCT ACCTGCTCCATTATCTGTACC-3'), los cuales amplifican un fragmento de 990 a 1000 pb.

Todas las reacciones incluyeron control positivo (ADN de cultivo de *R. parkeri*) y negativo (agua estéril). La electroforesis de todos los productos de PCR se realizó en geles de poliacrilamida al 8 %, teñidos con bromuro de etidio. La visualización final se hizo en un fotodocumentador (Bio-Rad®, California, Estados Unidos).

Los productos positivos de *htrA* se purificaron con el estuche comercial QIAquick® PCR Purification (QIAGEN®, California, Estados Unidos), de acuerdo con las especificaciones del fabricante y fueron enviados para secuenciación al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa MEGA versión 6.0 y posteriormente analizadas con la herramienta *BLAST*, para determinar los porcentajes de cobertura e identidad con secuencias previamente depositadas en el *GenBank*, utilizando el algoritmo *Megablast*.

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 291 garrapatas en 95 perros domésticos, pertenecientes a tres géneros: *Amblyomma* (55.7%, 162/291), *Rhipicephalus* (34%, 99/291) e *Ixodes* (10.3%, 30/291), y a tres especies: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Ixodes affinis* y *Amblyomma mixtum*. De los perros muestreados, 69 (72.6%, 69/95) presentaron infestaciones severas con garrapatas de diferentes géneros, especies, sexos y estadios de desarrollo vital.

Se recolectaron individuos de los tres estadios de desarrollo vital: ninfas (49.8%, 145/291), larvas (6.9%, 20/291) y adultos (43.3%, 126/291) y de ambos sexos: hembras (38.9%, 49/126) y machos (61.1%, 77/126).

A la exploración física, ninguno de los perros evidenció signos clínicos compatibles con rickettsiosis, aunque la mayor parte de ellos presentaron alergias por

picadura de ectoparásitos, así como diversos grados de desnutrición o abandono.

Los ectoparásitos colectados se agruparon en 105 viales. Doce (11.4%, 12/105) resultaron positivos para cualquiera de los genes de *Rickettsia* spp., seis (50%, 8/12) únicamente para *htrA*, cuatro (33.3%, 4/12) solamente para *rOmpB* y dos (16.7%, 2/12) para ambos. Al menos un vial con cualquiera de los géneros (*Ixodes*, *Amblyomma* o *Rhipicephalus*) encontrados en el presente estudio fue positivo para algún gen. Las especies positivas fueron *Rh. sanguineus s.l.*, *A. mixtum* e *I. affinis*. De igual forma, la infección se detectó en larvas, ninfas, adultos, machos y hembras (Cuadro 1).

El análisis de alineamiento de cada secuencia obtenida arrojó 96% de identidad y cobertura para distintas secuencias de especies patógenas, entre ellas *R. typhi* (acceso GenBank KC469609.1), *R. felis* (acceso GenBank CP000053.1) y *R. prowazekii* (acceso GenBank AY570301.1), por lo que no fue posible determinar la especie infectante. Asimismo, dicho análisis no mostró secuencias pertenecientes a rickettsias simbiotes no patogénicas para seres humanos o animales.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren la participación de las garrapatas en los ciclos de transmisión de las fiebres rickettsiales en habitantes y animales domésticos de la comunidad de estudio. Los hallazgos positivos para los fragmentos de los genes *htrA* (17-kDa) y *rOmpB*, demuestran que *Rickettsia* spp. circula en algunas especies de garrapatas recolectadas en el presente estudio, reforzando además la asociación de estos artrópodos en el mantenimiento de las rickettsiosis en ambientes rurales, tanto en seres humanos como en animales (25).

Los géneros y especies de garrapatas presentes en esta investigación han sido previamente identificadas en Yucatán, México (16-19, 26). Como ya se ha demostrado, *Amblyomma* y *Rhipicephalus* (los géneros más numerosos), parasitan habitualmente perros domésticos en medios rurales (27), aunque *Rh. sanguineus s.l.* circula también en condiciones urbanas, dependiendo de factores como el clima,

CUADRO 1

Estadio de desarrollo vital, sexo, género y especie de las garrapatas recolectadas en perros de Bolmay, Yucatán, que resultaron positivos a los genes de *Rickettsia* spp.

ID Vial	Número de ejemplares	Estadio de desarrollo vital	Sexo	Género	Especie	Genes de <i>Rickettsia</i> spp.	
						<i>htrA</i>	<i>rOmpB</i>
1	2	Ninfa		<i>Amblyomma</i>		-	+
8	6	Larva		<i>Rhipicephalus</i>	<i>Sanguineus</i>	+	-
14	7	Larva		<i>Amblyomma</i>		-	+
26	2	Ninfa		<i>Amblyomma</i>		+	-
35	2	Adulto	Macho	<i>Rhipicephalus</i>	<i>Sanguineus</i>	-	+
40	4	Ninfa		<i>Amblyomma</i>		+	-
44	1	Adulto	Hembra	<i>Amblyomma</i>	<i>mixtum</i>	-	+
52	2	Adulto	Hembra	<i>Rhipicephalus</i>	<i>Sanguineus</i>	+	+
66	8	Larva		<i>Amblyomma</i>		+	-
67	3	Ninfa		<i>Amblyomma</i>		+	-
69	8	Ninfa		<i>Amblyomma</i>		+	-
102	3	Adulto	Macho	<i>Ixodes</i>	<i>Affinis</i>	+	+

ID: identificación

+: positivo

-: negativo

el número de hospederos y la geografía, entre otros (28). Por su parte, el género *Ixodes* infesta habitualmente animales en contacto con ambientes silvestres o peri-domésticos (29) e identificarlo en perros de comunidades rurales en Yucatán, se debe principalmente a que algunas veces son utilizados en actividades como la cacería de subsistencia (27).

De las garrapatas recolectadas en este estudio, particularmente el complejo *Amblyomma* spp., ha sido descrita como positiva a *Rickettsia* spp. (30); no obstante, los ejemplares se tomaron de ganado bovino procedente de distintos ranchos de Yucatán. Por otro lado, Zavala-Velázquez *et al.* (31), colectaron ejemplares de *Amblyomma* spp. y *Rh. sanguineus s.l.* que parasitaban perros, pero no obtuvieron evidencia molecular de la infección con *Rickettsia* spp.

En el trabajo de Dzúl-Rosado *et al.* (32), se reportó la presencia de *R. typhi* en seis ejemplares adultos de *Rh. sanguineus s.l.*, que infestaban perros en una comunidad rural con historial de enfermedades rickettsiales en sus habitantes. Asimismo, Braga-

Ordóñez *et al.* (33) y Peniche-Lara *et al.* (34), detectaron ADN de *R. rickettsii* en *Rh. sanguineus s.l.* recolectadas de perros provenientes de comunidades rurales del estado de Yucatán. Con referencia a estos hallazgos, se concluye que la presente es la primera evidencia molecular de la infección con *Rickettsia* spp. en garrapatas *I. affinis* recolectadas en Yucatán.

La presencia de garrapatas positivas en perros domésticos infectados con *Rickettsia* spp. ya ha sido documentada en la región (14, 35), por lo que estos ectoparásitos también representan un posible factor de riesgo para la transmisión *Rickettsia* spp. a otros animales domésticos, debido a su notable capacidad para parasitar numerosas especies de hospederos susceptibles, incluidos los seres humanos (26, 36).

Rhipicephalus sanguineus s.l. es la garrapata más distribuida en Yucatán, incluso ha sido recolectada de habitantes accidentalmente parasitados es distintas comunidades (26), por lo que generalmente está asociada con poblaciones de perros en cercanía con ellos (32, 37). Aspecto que pudo contribuir para que las personas de la comunidad de estudio enfermen

de rickettsiosis; no obstante, esta hipótesis no pudo ser demostrada, aunque en un estudio previo, se ha documentado la presencia de *R. typhi* en garrapatas del género *Rhipicephalus* (32).

Por su parte, *I. affinis* generalmente no parasita seres humanos (38); sin embargo, ocasionalmente ha sido identificada en personas y perros de Yucatán (26, 39). Caso similar con *A. mixtum*, la cual ha sido descrita en perros de una comunidad del Estado (26). Por otra parte, las garrapatas del complejo *Amblyomma* spp. (positiva en el presente estudio) han sido reconocidas como los vectores más relevantes en el ciclo de transmisión de *R. rickettsii* en países sudamericanos como Argentina, Brasil y Colombia, reportándose como la más frecuente en parasitismos accidentales de seres humanos (40).

El hallazgo de la probable circulación de rickettsias patógenas en garrapatas *I. affinis* y *Rh. sanguineus* s. l. es doblemente relevante, debido a que previamente, Solís-Hernández y colaboradores, detectaron la infección con *Borrelia burgdorferi sensu lato*, agente causal de la enfermedad de Lyme o borreliosis (que afecta a seres humanos y animales), en ejemplares recolectados de perros de una comunidad rural de Yucatán, México. Asimismo, los perros infestados presentaron evidencia molecular de infección, por lo que el riesgo potencial para la transmisión de estos agentes etiológicos a las poblaciones humanas es alto, debido al estrecho contacto entre estos animales, sus ectoparásitos y las personas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a los habitantes y autoridades municipales de Bolmay, Yucatán, por permitirnos la manipulación de sus mascotas y por su invaluable ayuda durante el proyecto.

REFERENCIAS

1. Sparagano OAE, Allsopp MTEP, Mank RA, Rijpkema SGT, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exp Appl Acarol*. 1999 Dec; 23(12): 929-960.
2. Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. *Rickettsia* phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PLoS One*. 2008 Apr; 3(4): e2018. doi: 10.1371/journal.pone.0002018.
3. Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc Biol Sci*. 2006 Sep 7; 273(1598): 2097-2106.
4. Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, et al. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir host for *Rickettsia Helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors*. 2009 Sep 4; 2: 41. doi: 10.1186/1756-3305-2-41.
5. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez J, Sulú-Uicab J. Murine typhus in child, Yucatan, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jun; 15(6): 972-974. doi: 10.3201/eid1506.081367.
6. Zavala-Castro JE, Dzúl-Rosado KR, Peniche-Lara G, Tello-Martín R, Zavala-Velázquez JE. Isolation of *Rickettsia typhi* from human, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2014 Aug; 20(8): 1411-1412. doi: 10.3201/eid2008.130095.
7. Zavala-Velázquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sánchez-Eliás RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. *Rickettsia felis* Rickettsiosis in Yucatán. *Lancet*. 2000 Sep 23; 356(9235): 1079-1080.
8. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez J, Walker D, Pérez-Orsorio J, Peniche-Lara G. Severe human infection with *Rickettsia felis* associated with hepatitis in Yucatan, Mexico. *Int J Med Microbiol*. 2009 Nov; 299(7): 529-533. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.03.002.
9. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz-Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, et al. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatan, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2006 Apr; 12(4): 672-674. doi: 10.3201/eid1204.051282.
10. Zavala-Castro JE, Dzúl-Rosado KR, Arias-León JJ, Walker DH, Zavala-Velázquez JE. An increase in human cases of Spotted Fever Rickettsiosis in Yucatan, Mexico, involving children. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Dec; 79(6): 907-910.
11. Lugo-Caballero C, Dzúl-Rosado K, Rodríguez-Moreno G, Tello-Martín R, López-Ávila K, Zavala-Castro J. Caso fulminante de rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en una lactante del sureste de México. *Arch Argent Pediatr*. 2017 Feb; 115(1): e5-e8. doi: 10.5546/aap.2017.e5.
12. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Peniche-Lara GF, Sulú-Uicab JE. Human Rickettsialpox, southeastern Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2009 Oct; 15(10): 1665-1667. doi: 10.3201/eid1510.081507.
13. Reyes-Novelo E, Ruiz-Piña H, Escobedo-Ortegón J, Rodríguez-Vivas I, Bolio-González M, Polanco-Rodríguez Á, et al. Situación actual y perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y olvidadas de la Península de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2011 Ene-Abr; 14(1): 35-54.
14. Martínez-Ortiz D, Torres-Castro M, Koyoc-Cardena E, López K, Panti-May A, Rodríguez-Vivas I, et al.

- Detección molecular de *Rickettsia typhi* en perros de una comunidad rural de Yucatán, México. Biomedica. 2016 Feb 23; 36(0): 45-50. doi: 10.7705/biomedica.v36i2.2913.
15. Solís-Hernández A, Rodríguez-Vivas RI, Esteve-Gasent MD, Villegas-Pérez SL. Detección de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en perros y sus garrapatas en comunidades rurales de Yucatán, México. Rev Biol Trop. 2018 March; 66(1): 428-437.
16. Guzmán-Cornejo C, Robbins RG, Pérez TM. The *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of Mexico: parasite-host and host-parasite checklists. Zootaxa. 2007 Aug 20; 1553(1): 47-58.
17. Guzmán-Cornejo C, Robbins RG. The genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) in Mexico: adult identification keys, diagnoses, hosts, and distribution. Rev. Mex. Biodiv. 2010 Jan; 81(2): 289-298.
18. Guzmán-Cornejo C, Robbins RG, Guglielmone AA, Montiel-Parra G, Pérez TM. The *Amblyomma* (Acari: Ixodida: Ixodidae) of Mexico: identification keys, distribution and hosts. Zootaxa. 2011 Aug 18; 2998: 16-38.
19. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis. 2014 Apr; 5(3): 252-76. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.
20. Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CCA, Silva JrA, Almeida MR, Almada G, et al. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008 Mar; 103(2): 191-194.
21. Webb L, Mitchell C, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1990 Mar; 28: 530-534.
22. Schrieffer ME, Sacchi JrJB, Dumler S, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. J Clin Microbiol. 1994 Apr; 32: 949-954.
23. Faccini-Martínez AA, Costa FB, Hayama-Ueno TE, Ramírez-Hernández A, Cortés-Vecino JA, Labruna MB, et al. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* ticks, Colombia. Emerg Infect Dis. 2015 Mar; 21(3): 537-953. doi: 10.3201/eid2013.140721.
24. Peniche-Lara G, Zavala-Velázquez J, Dzúl-Rosado K, Walker DH, Zavala-Castro JE. Simple method to differentiate among *Rickettsia* species. J Mol Microbiol Biotechnol. 2013 Apr 13; 23(3):203-208. doi: 10.1159/000348298.
25. Loftis AD, Kelly PJ, Freeman MD, Fitzharris S, Beeler-Marfisi J, Wang Ch. Tick-borne pathogens and disease in dogs on St. Kitts, West Indies. Vet Parasitol. 2013 Sep 1; 196(1-2): 44-449. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.024.
26. Rodríguez-Vivas RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martínez I, Reyes-Novelo E, Esteve-Gasent MD, et al. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. Vet Parasitol. 2016 Jan 15; 215:106-113. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.11.010.
27. Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI, Esteve-Gasent MD, Pérez de León AA, Modarelli JJ, Villegas-Pérez SL. Ticks infesting dogs in rural communities of Yucatan, Mexico and molecular diagnosis of rickettsial infection. Transbound Emerg Dis. 2019 Jan;66(1):102-110. doi: 10.1111/tbed.12990.
28. Abarca A, Gárate D, López J, Acosta-Jamett G. Flea and ticks species from dogs in urban and rural areas in four districts in Chile. Arch Med Vet. 2016; 48(2): 247-253. doi: 10.4067/S0301-732X2016000200017.
29. Lopes MG, May-Junior J, Foster RJ, Harmsen BJ, Sanchez E, Martins TF, et al. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. Parasit Vectors. 2016 Feb 2; 9:62. doi: 10.1186/s13071-016-1348-1.
30. Peniche-Lara G, Dzúl-Rosado K, Jiménez-Delgadillo B, Vado-Solís I, Pérez-Orsorio C, Zavala-Castro J. Identificación de *Rickettsia* spp. en garrapatas *Amblyomma cajennense* parasitando bovinos en ranchos del estado de Yucatán. Ciencia y Humanismo en la Salud. 2014 Abr; 1(1): 23-27.
31. Zavala-Velázquez JE, Zavala-Castro JE, Vado-Solís I, Ruiz-Sosa JA, Moron CG, Bouyer DH, et al. Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico. Vector Borne Zoonotic Dis. 2002 Summer; 2(2): 69-75.
32. Dzúl-Rosado K, Lugo-Caballero C, Tello-Martín R, López-Ávila K, Zavala-Castro J. Direct evidence of *Rickettsia typhi* infection in *Rhipicephalus sanguineus* ticks and their canine hosts. Open Vet J. 2017 Jun; 7(2): 165-169. doi: 10.4314/ovj.v7i2.14.
33. Braga-Ordóñez J, Balmaceda L, Pérez-Orsorio C, Peniche-Lara G. Garrapatas (Ixodidae), potenciales transmisores de *Rickettsia rickettsii* en un municipio con alta frecuencia de infección por rickettsiosis. Ciencia y Humanismo en la Salud. Agos; 3(2): 56-60.
34. Peniche-Lara G, Jiménez-Delgadillo B, Muñoz-Zanzi C, Cárdenas-Marrufo M, Pérez-Orsorio C, Juan Arias-León J. Presence of *Rickettsia* species in a marginalized area of Yucatan, Mexico. J Trop Med. 2018 Jun 5; 2018: 7675828. doi: 10.1155/2018/7675828.
35. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, del Rosario-García M, León JJ, Dzúl-Rosado KR. A dog naturally infected with *Rickettsia akari* in Yucatan, México. Vector

- Borne Zoonotic Dis. 2009 Jun; 9(3):345-7. doi: 10.1089/vbz.2008.0189.
36. Betancur O, Betancourt A, Giraldo C. Importance of ticks in the transmission of zoonotic agents. *Rev MVZ Córdoba* 2015 Dec; 20(Suppl. 1): 5053-5067.
 37. Szabó MP, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitology*. 2013 May; 140(6): 719-28. doi: 10.1017/S0031182012002065.
 38. Allan S. Ticks (Class Arachnida: Order *Acarina*). In: Samuel WS, Pybus MJ, Kocan AA. Parasitic diseases of wild animals. Iowa: Iowa State University Press; 2001. P. 72-106.
 39. Solís-Hernández A, Rodríguez-Vivas RI, Pérez-Barrera MA, Esteve-Gassent MD, Apanaskevich DA. *Ixodes affinis* (Acari: Ixodidae) in dogs from rural localities of Yucatán, Mexico: Prevalence, abundance and associated factors. *Vet Mex OA*. 2015 Aug; 2(3). doi: 10.21753/vmoa.2.3.351.
 40. Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol*. 2006 Nov 14; 40(2): 83-100.