Uso de diferentes métodos de conservación de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* para mejorar la extracción de ADN de bacterias *rickettsiales*

Carlos-Eduardo Aragón-López, Pablo Luna-Nevárez, Verónica Ortiz-Encinas, Jose-Clemente Leyva-Corona, Mario Rojas-Arzaluz y Javier-Rolando Reyna-Granados*

Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del ITSON.
Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Unidad Nainari. Antonio Caso s/n. Col. Villa ITSON. CP 85130. Ciudad Obregón, Sonora, México.

Artículo recibido 11 de mayo de 2021 y aceptado el 7 de junio de 2021

Use of different conservation methods for Rhipicephalus sanguineus ticks to improve DNA extraction from rickettsial bacteria.

Abstract

The *Rhipicephalus sanguineus* tick is a hemoparasite of importance in public health because it is the vector of rickettsiosis, ehrlichiosis, and anaplasmosis in humans. The identification of these agents by molecular diagnosis depends of an efficient obtaining of nucleic acids. The objective of the study was to evaluate different tick conservation and maceration methods for their subsequent use in obtaining DNA. Twenty-six replicates of ten ticks per replica we used for each preservation and maceration method. For the first method, we use liquid nitrogen, in the second, freezing at -80 °C was used, and in the third, it was agreed to dissect and macerate at room temperature. Subsequently, we used a commercial DNA extraction kit and the quantity, quality and purity of the DNA was measured by spectrophotometry and agarose gel. The conservation and maceration of the ticks in liquid nitrogen achieved the highest concentration (400 ng / µl), quality and purity of DNA and amplified 100% of the replicas. With the method of freezing at -80 ° C, up to 210 ng / µl and an amplification of 92.3% were obtained, the procedure carried out at room temperature being in third place, with which a concentration of 100 ng / µl was obtained and an 84.6% amplification. Only the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma* were positive by PCR. Therefore, it is concluded that with the method of conservation and maceration in liquid nitrogen, DNA will be obtained in quantity and quality that will favor the detection of zoonotic diseases transmitted by ticks.

Key words: conservation, *Rhipicephalus sanguineus,* DNA, extraction, PCR, rickettsiales, zoonosis.

Resumen

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, es un hemoparásito de importancia en salud pública debido a que es el vector de la *rickettsiosis*, *ehrlichiosis* y *anaplasmosis* en humanos. La identificación de estos agentes por técnicas moleculares de diagnóstico depende de una eficiente obtención de ácidos nucleicos. El objetivo del estudio fue evaluar diferentes métodos de conservación y maceración de las garrapatas para su posterior uso en la obtención de ADN. Se utilizaron 26 réplicas de 10 garrapatas por réplica para cada método de conservación y maceración. Para el primer método se utilizó nitrógeno líquido, en el segundo se utilizó congelación a -80 °C y en el tercero se acordó disecar y macerar a temperatura ambiente. Posteriormente, utilizamos un kit de extracción de ADN comercial se midió la cantidad, calidad y pureza del ADN mediante

*Autor de correspondencia
Email: javier.reyna@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)
DOI: https://doi.org.1033154/rlrn.2021.01.01

espectrofotometría y gel de agarosa. La conservación y maceración de las garrapatas en nitrógeno líquido logró la mayor concentración (400 ng/µl), calidad y pureza de ADN y amplificó el 100% de las réplicas. Con el método de congelación a -80 ° C, se obtuvieron hasta 210 ng/µl y una amplificación del 92,3%, quedando en tercer lugar el procedimiento realizado a temperatura ambiente, con lo cual se obtuvo una concentración de 100 ng/µl y una amplificación del 84,6%. Solo los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* fueron positivos por PCR. Por tanto, se concluye que con el método de conservación y maceración en nitrógeno líquido se obtendrá ADN en cantidad y calidad que favorecerá la detección de enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas.

Palabras claves: conservación, *Rhipicephalus sanguineus*, extracción de ADN,PCR, rickettsiales, zoonosis.

Introducción

El principal transmisor de enfermedades *rickettsiales* es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus,* también llamada la garrapata café del perro. En zonas urbanas, la garrapata es el principal vector de hemoparásitos de importancia zoonótica, siendo los perros los principales hospederos y accidentalmente los humanos. El impacto en salud pública de la garrapata es por la transmisión de enfermedades infecciosas como *rickettsiosis*, *ehrlichiosis*, *anaplasmosis*, *borreliosis*, entre otras (Shaw *et al*., 2001; Rodríguez, 2019).

Por cambios en los patrones climáticos, la presencia de la garrapata cada vez es más frecuente en zonas templadas y urbanizadas (Shaw *et al*., 2001). México presenta condiciones ideales para el ciclo de transmisión de enfermedades *rickettsiales* y su prevalencia se ha asociado comúnmente a condiciones de vida, ya que la mayoría de los casos presentados han ocurrido en zonas marginadas y rurales de México (Peniche *et al*., 2015). Cuando la garrapata infectada muerde al hospedero para alimentarse, inocula el agente al torrente sanguíneo a través de la saliva. Otra forma de contagio es el contacto con aerosoles que contienen la garrapata aplastada o animales infectados y se exponen a heridas externas o laceraciones (López *et al*., 2007; *Herrero et al., 2010*; Castillo *et al*., 2015).

La identificación de enfermedades rickettsiales solo por la signología de los hospederos no es precisa, ya que son signos inespecíficos y fácilmente pueden confundirse (Peniche *et al*., 2015). El diagnóstico oportuno es esencial para tratar esta enfermedad y el organismo puede recuperarse sin secuelas. En humanos las técnicas comúnmente utilizadas son pruebas serológicas como Inmunofluorescencia indirecta (Freitas *et al*., 2010), pero se ha reportado que no es muy específica, especialmente en pacientes con enfermedad aguda (Brouqui et al., 2004). La prueba de ELISA es eficaz en detectar la familia *Rickettsiaceae* y en caso de cultivos bacterianos se tendrían resultados muy tardíos (Dumler *et al*., 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede detectar la mayoría de organismos que pertenecen al género en cuestión utilizando cebadores de *Ehrlichia* spp y *Rickettsia* spp., la mayoría de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* (Dawson *et al*., 1994; Murphy *et al*., 1998; Mafra *et al*., 2015; Tintel *et al*., 2016). Muchos laboratorios utilizan en primer lugar los cebadores genéricos y si se obtiene un resultado positivo, se usan cebadores específicos para identificar el agente en concreto. Actualmente en investigaciones se propone como un diagnóstico rápido y confiable la utilización de PCR (Álvarez *et al*., 2015).

Para realizar la amplificación de algún gen de interés se requiere de la obtención de DNA bacteriano íntegro, de calidad y en concentración a partir de las garrapatas (Guevara *et al*., 2015), siendo esto un factor determinante en la estandarización de un diagnóstico rápido y eficiente. En la literatura existe información sobre los métodos más efectivos para aislar DNA bacteriano en cualquier especie de garrapata (Rojas *et al*., 2013), que van desde el uso de productos comercialmente, basados en columnas, hasta métodos tradicionales de laboratorio, como es el fenol-cloroformo y altas concentraciones salinas (Aljanabi & Martínez, 1997; Halos et al. 2004; Ammazzalorso *et al*., 2015; Guevara *et al*., 2019). pero no del método por el cual se puede obtener la mayor concentración de ADN de los agentes *rickettsiales* contenidos en la garrapata. El macerar por distintos métodos puede lisar las células de las garrapatas en diferente grado y en consecuencia

colectar mayor cantidad de ADN bacteriano. Por tal motivo, el objetivo del presente ensayo fue evaluar la concentración de ADN obtenida mediante diferentes métodos de macerado de garrapatas.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Sonora, en Cd. Obregón Sonora, al noroeste de México. En donde la temperatura máxima promedio es de 38°C y se presenta en los meses de junio y julio, donde las regiones con las temperaturas más altas son las que comprenden los municipios de Navojoa y Cajeme en el extremo sur de la entidad (INEGI, 2019*).*

Colecta de garrapata

Durante los meses de julio y agosto del 2019 en seis colonias diferentes de Cd Obregón Sonora, utilizando pinzas de borde romo se colectaron 780 garrapatas entre machos y hembras en diferentes estadios, las cuales provenían de cualquier región corporal de 130 perros domésticos de 57 casas muestreadas. Las garrapatas se colocaron en viales con entrada de aire y transportadas al laboratorio para ser introducidas en mini Incubadora (Labnet®) a 37°C sin alimentar, garantizando que los posibles agentes infecciosos, no provengan de la sangre ingerida.

Identificación taxonómica de las garrapatas

La clasificación taxonómica de las garrapatas fue determinada individualmente mediante estándares y parámetros utilizando las claves de manuales establecidos (López,1980; Barros et al.,2006). Para conservar los especímenes se realizó un lavado con benzal al 10% y posteriormente se colocaron en grupos o individualmente en tubos Eppendorf de 1.5ml libres de nucleasas y listas para el macerado.

Métodos de macerado y extracción de material genético

Los métodos de macerado que se evaluaron fueron 1. Con nitrógeno líquido (MNIT), 2. Congelado a -80°C (M80), y 3. Con bisturí a temperatura ambiente (MTA). Por cada método de macerado se utilizaron 260 garrapatas, divididas en 26 réplicas de 10 garrapatas por réplica. Después del macerado se inició con la extracción de ADN mediante un kit comercial (DNeasy Blood and Tissue kit de Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cantidad, calidad y pureza de ADN se midió en un espectrofotómetro automático BioSpect-nano, UV-VIS Spectrophotometer for Life Sciences (Shimadzu), tomando en cuenta las medidas espectrofotométricas para determinar la pureza, usando como indicador la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm. La integridad se observó en gel de agarosa al 1.5% teñido con 1.5 µl de bromuro de etidio. Las muestras de ADN se conservaron en viales estériles de 1.5 ml a una temperatura de -20°para ser utilizados por la técnica de PCR posteriormente.

Amplificación por PCR

Todas las muestras de ADN se analizaron para detectar la presencia de agentes rickettsiales por duplicado mediante un ensayo de PCR, dirigido primeramente a un fragmento de 478 pb del gen ARN ribosomal (ARNr) 16s para el género Ehrlichia y Anaplasma, utilizando los cebadores ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGAAGCC-3') ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3'). La amplificación por PCR se realizó utilizando el termociclador de PCR punto final (C1000 TouchTM, Bio-rad®) en un total de 25 µl conteniendo 5 µl de ADN en un volumen final, 1X Green GoTaq® Buffer 5x (PROMEGA®), 0.2 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 1.25 U Taq ADN polimerasa (GoTaq® DNA Polymerase PROMEGA), 1 pmol de cada primer y H_2O libre de nucleasas. La desnaturalización inicial se realizó a 94°C a 2 minutos, seguida de 94°C a 30 segundos, 61°C a 1 minuto, 39 ciclos, 72°C a 1.30 minutos, una extensión final de 72°C a 7 minutos y 4°C para la conservación de la muestra. Para identificar la presencia del género Rickettsia se utilizaron los cebadores CS78 (5´-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3´) y CS323 (5´-GCTTCC TTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3´) que amplifica un fragmento de 401 pb del gen gltA. La reacción de los PCR se realizó como anteriormente se describió, en un volumen final de 25 µl con la enzima GoTaq® DNA Polymerase (PROMEGA), excepto por la temperatura de alineamiento que fue de 48°C para la amplificación.

Evaluación de calidad y cantidad de ADN de garrapatas

El ADN extraído de las muestras de R. sanguineus se evaluaron cuantitativamente, en un espectrofotómetro BioSpect-nano, UV-VIS Spectrophotometer for Life Sciences (Shimadzu), para determinar el rendimiento de cada protocolo y parámetros de pureza relativa (Relación 260/230, contaminación por proteínas y compuestos fenólicos y carbohidratos). La integridad del DNA extraído fue verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se conservaron en viales estériles de 2ml.

Resultados

Todas las garrapatas recolectadas coincidieron con la morfología de la garrapata de la familia Ixodidae, género *Rhipicephalus* y especie *Rhipicephalus sanguineus* llamada también la garrapata café del perro (Figura 1).

El macerado de garrapatas con el método MINT concordó con una cuantificación de 400 ng/µl (Figura 2). Respecto al macerado M80 se observó una banda menos intensa que el MINT, concordando con una cuantificación aproximada de 210 ng/µl. Por último, el macerado MTA mostró las bandas más tenues que con los otros macerados

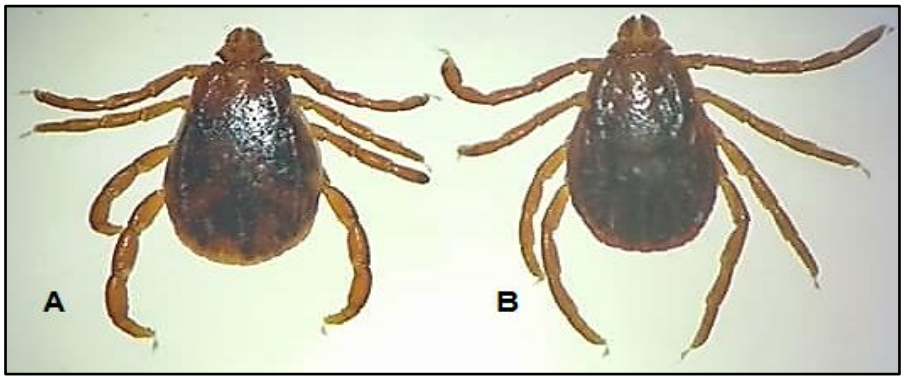


Figura 1. A) Ejemplar adulto de *Rhipicephalus sanguineus* macho. B) Ejemplar adulto de *Rhipicephalus sanguineus* hembra (Caraveo., 2017).

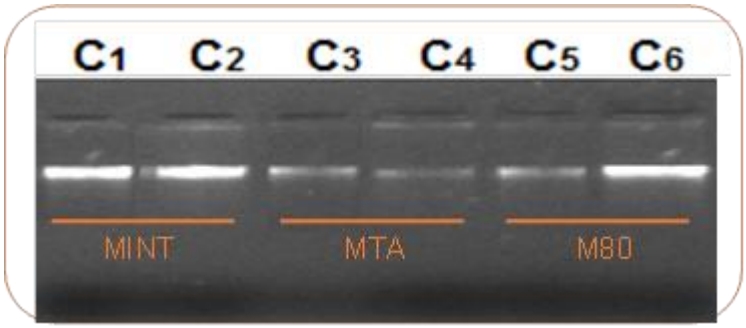


Figura 2. Extracción de ADN con diferentes métodos de conservación: C1 y C2 MINT, C3 y C4 MTA, C5 y C6 M80, en gel de agarosa al 1.5%.

(100 ng/µl), y en algunos casos un barrido tenue, mostrando poca degradación con este método, (Tabla 1) concordando con la cuantificación del material genético.

En la valoración molecular por PCR de los macerados, se compararon con base en el éxito de amplificación de los géneros *Ehrlichia, Anaplasma* y *Rickettsia*. El MINT amplificó el 100% de los grupos para *Ehrlichia* y *Anaplasma*, seguido por el M80, con 92.3 %y finalmente el método de macerado MTA con 84.6% con un aumento en los microlitros de ADN (Figura 3). A diferencia de estos géneros, todos los grupos de garrapatas resultaron negativos al género *Rickettsia*.

Discusión

En muestreos realizados en diferentes estados del país, como, Baja California, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora, han reportado la mayoría de ellos que el 100% de los ectoparásitos en perros pertenecen a la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Castillo *et al*., 2015; Tinoco *et al*., 2016), al igual que nuestro muestreo en el área del sur de Cajeme, Sonora, donde se reportó el 100% de los ectoparásitos recolectados pertenecientes a la especie *Rhipicephalus sanguineus*, pero difiriendo en lo reportado en los estados de Coahuila con un bajo índice del género *Otobius* (Castillo *et al*., 2015).

Con el paso del tiempo y con base en las investigaciones, se ha mejorado el diagnóstico molecular para la detección de *rickettsiales* a partir de garrapatas, ya que se caracteriza por ser una técnica muy difícil de estandarizar (Álvarez *et al*., 2017). En pocas investigaciones mencionan que la integridad y la calidad del material genético es importante para el diagnóstico de enfermedades

Tabla 1. Parámetros obtenidos de los diferentes métodos de conservación de garrapatas.

Macerado	Tiempo	Concentración	Integridad	Amplificación
MNIT	4 horas	400 ng/µl	✓	✓
M80	4 horas	210 ng/µl	✓	✓
MTA	5 horas	100 ng/µl	Poca degradación	✓

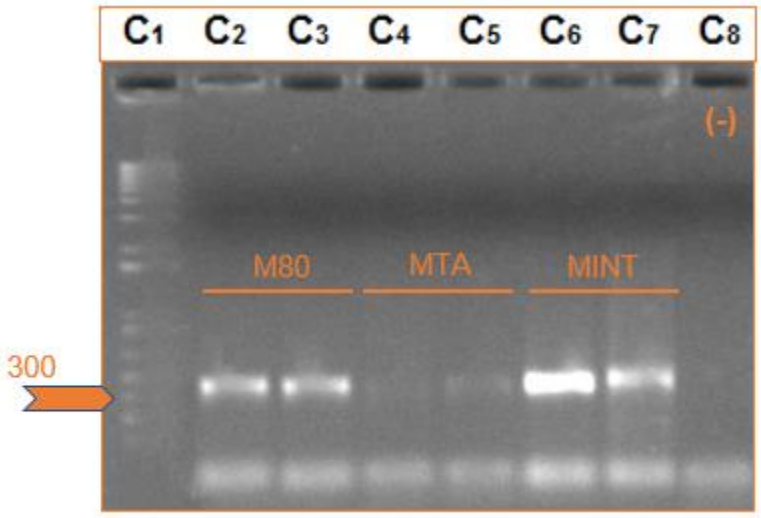


Figura 3. **Amplificación de ARN ribosomal 16s (478pb) para el género *Ehrlichia* y *Anaplasma* en gel de agarosa al 1.5%. C1peso molecular 100pb, C2 y C3 M80, C4 y C5 MTA, C6 y C7 MINT, C8 control negativo.**

causadas por el vector *Rhipicephalus sanguineus*. Dichas investigaciones han comparado métodos de extracción de kit comerciales, observando los mismos resultados en cuanto a integridad del ADN y concentración (Rojas *et al*., 2013). Sin embargo, al implementar la extracción de ADN con tiocianato de guanidina (Trizol), se logra un aumento en la concentración de ADN (Guevara *et al*., 2019), teniendo en similitud de que inician ambos trabajos con la disección de la garrapata. La metodología de este trabajo es similar a la utilizada por Rojas (2013), en la parte de extracción, con la diferencia que se realizaron distintos tipos de macerados para la extracción y a la vez se muestra la integridad del material genérico por electroforesis. Se observó que el MNIT fue más eficiente, logrando una reducción en el tiempo del protocolo y un aumento a 400 ng/µl en la concentración, mucho mejor a lo reportado por Guevara (2019), en la extracción de ADN con tiocianato de guanidina (Trizol). Este es el primer estudio, en donde se demuestra que el macerado de la garrapata es un factor importante para el diagnóstico de rickettsiales en dichos ectoparásitos.

Los resultados obtenidos en el trabajo demuestran que el proceso de conservación y macerado para la obtención de una excelente integridad y calidad de ADN son muy importantes, debido a que la garrapata contiene inhibidores en el intestino que degradan al material genético ocasionando falsos negativos al momento de utilizar la técnica de PCR (Posada *et al*., 2017; Tamez, 2015; Rojas *et al*.,2013; Tinoco *et al*., 2015).

Aunque ya se demostró que en Sonora existe la prevalencia del género *Ehrlichia* y *Anaplasma (*Sosa *et al.*, 2014*)*, los resultados positivos para PCR confirman la existencia de ambos géneros en garrapatas en el sur de Cajeme, Sonora, siendo el primer reporte de esta asociación en la región.

Conclusiones

Se logró la extracción de ADN en el vector, estableciendo que el método más eficiente para la obtención del material genético resultó ser el macerado con nitrógeno líquido. Lo anterior incrementó la concentración máxima a 400 ng, disminuyendo la degradación y tiempo, al evitar la disección de la garrapata. El macerado con nitrógeno líquido favoreció la detección de especies *rickettsiales* mediante PCR en punto final, el cual nos proporciona un diagnóstico preciso y rápido.

Referencias

Aljanabi, S., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCRbased techniques. Nucleic Acids Res. 25:4692-4693. https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692

Ammazzalorso, A., Zolnik, C., Daniels, T., Kolokotronis, S. 2015. To beat or not to beat a tick: Comparison of DNA extraction methods from ticks (Ixodes scapularis). Peer J. 13(3): https://doi.org/10.7717/peerj.1147

Álvarez, G., Candia, M.C., Bolado, E., Delgado, J., Soto, A., López, L.F. 2015. Fiebre manchada por Rickettsia rickettsii en las Américas: un problema creciente de salud pública. Rev Univ Ind Santander Salud. 47(3): 243-259. http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v47n3-2015001

Álvarez, H.G., González, R.J.F., Hernández, M.N.S., Lash, R.R., Barton, B.C. Paddock, C.D. 2017. Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. Recuperado de http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1

Barros, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H. 2006. Carrapatos de importância médico- veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. 223.

Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borbacteriadiseases in Europe. Clin Microbiol Infect.;10(12):1108-1132. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x

Castillo, A., Cueto, S.M., Hernández, S., Gallegos, M.Á., Valdés, M.T., Sánchez, F.J., Ortega, A.I. 2015. Detección de Rickettsia sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México. *Acta zoológica mexicana*. 31(1):80-83. Recuperado en 27 de julio de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065173720150001000 11&lng=es&tlng=es.

Dawson, J.E., Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W.R. 1994 Susceptibility of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. J Clin Microbiol; 32(11): 2725-2728. PMid:7852563. doi: 10.1128/jcm.32.11.2725-2728.1994.

Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions 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(6), 2145–2165. https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145

Freitas, M.C.D., Grycajuk, M., Molento, M. B., Bonacin J., Labruna, M. B., Pacheco, R., Biondo, A. W. 2010. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 19(2), 130-131.

Guevara, M., Vertel, M., Paternina, L. 2019. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de garrapatas duras (Acari: Ixodidae). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *22*(1). https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n1.2019.1208

Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le menach, A., Boulouis, H., Vayssiertaussat, M. 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from

ticks. Vet. Res. 35:709-713. https://doi.org/10.1051/vetres:2004038

Herrero, J.A., García, E., Hernández, A., Gómez, J. 2010. Infecciones por rickettsias y fiebre Q. *Medicine Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 10(57):3881-3888. https://doi.org/10.1016/s0304-5412(10)70131-1 https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01856-0

Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Actualizado: 15-marzo-2019 cienciaspecuarias.inifap.gob.mx

La-scola, B., Raoult, D. 1997 Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J Clin Microbiol 35: 2715–27.

López, G. Biología, morfología y taxonomía de garrapatas de interés económico, En: Control de garrapatas. Medellín: Instituto Colombiano Agropecuario, Compendium 39; 1980a. p. 1-16

López, P.J., Abarca, V.K., Azócar, A.T. 2007. Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. *Revista chilena de infectología*. 24(3):189-193. https://doi.org/10.4067/s0716-10182007000300002

Mafra, C., Barcelos, R.M., Mantovani, C., Carrizo, J., Soares, A.C., Moreira, N.S., Maia, N.L., Silva, F.R., Silva, H.D., Boere, V., Silva, I. de O. 2015. Occurrence of *Ehrlichia canis* in free-living primates of the genus Callithrix. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 24(1), 78-81. https://doi.org/10.1590/s1984-29612015001

Murphy, G.L., Ewing, S.A., Whitworth, L.C., Fox, J.C.M., Kocan, A.A. 1998. A molecular and serologic survey of Ehrlichia ca nis, E. chaffeensis and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. Vet. Parasitol. 79(4):325-339. DOI: 10.1016/s0304-4017(98)00179-4

Peniche, L.G., Pérez, O.C., Dzul, R.K., Zavala, C.J. 2015. Rickettsiosis: Enfermedad Re-Emergente en México. *Ciencia y Humanismo en la salud*. 2:76-84. http://revista.medicina.uady.mx/revista/index.php/cienciayhumanismo/article/view/39

Posada, Z.J., Cabrera, J.A., Alvarez, D., Rodas, G.J., Monsalve, B.S., Londoño, B.A. 2017. Identificación de bacterias de la familia Anaplasmataceae en un albergue canino del municipio de Caldas, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*. 22(supl):6014-6022. https://doi.org/10.21897/rmvz.1071

Rodriguez, R.I., Esteve, M.D., Pérez, A., Modarelli, J.J., Villegas, S. 2019. 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, 10(2), 365-370. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.018

Rojas, A., Rueda, A., Mauricio, D.M., Mesa, N.C., Benavides, J.A., Imbachi, K., Álvarez, L., López, R. 2013. Identificacion de Ehrlichia canis Donatien Lestoquard Moshkovski mediante PCR anidada. 7(1): 37-48. file:///C:/Users/74998/Downloads/v7n1a03%20(2).pdf

Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J., Breitschwerdt, E.B. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. Trends in Parasitology.17(2):74-80.

Sosa, C.G., Vargas, M., Torres, J., Gordillo, M.G. 2014. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico. Journal of Biomedical Science and Engineering, 7, 884-889. DOI: 10.4236/jbise.2014.711087

Tamez, R. 2015. Detección de *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis* en garrapatas recolectadas de perros en Monterrey, Nuevo León, México. Tesis de posgrado. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. http://eprints.uanl.mx/9689/1/1080215171.pdf

Tinoco, G.L. 2015. Presencia de *rickettsia sp*. en garrapatas *ripicephalus sanguineus* de perros en Mexicali, Baja California, México. Baja California, México. Tesis de licenciatura. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Baja California, México. http://biblio.uabcs.mx/tesis/te3467.pdf

Tintel, M.J., Amarilla, P., Nara, E.M. 2016. *Ehrlichiosis*, enfermedad transmitida por garrapatas y potencial zoonosis en Paraguay. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 17(9),1-9 https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63647456006