



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Identificación Molecular y Análisis de la Relación Filogenética de Especies de Rickettsias Presentes en Garrapatas Provenientes de Tres Regiones de Colombia

Alejandro Ramírez Hernández

Médico Veterinario

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico
Bogotá D.C., Colombia
2014

Identificación Molecular y Análisis de la Relación Filogenética de Especies de Rickettsias Presentes en Garrapatas Provenientes de Tres Regiones de Colombia

Alejandro Ramírez Hernández

Médico Veterinario
Código: 05598861

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magister en Infecciones y Salud en el Trópico

Directora:

Marylin E. Hidalgo Díaz. M.Sc. Ph.D.

Codirector:

Jesús A. Cortés Vecino. D.M.V. M.Sc. Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico
Bogotá D.C., Colombia
2014

*A mi tribu
de ayer, hoy y siempre.
Ustedes han sido
mi mejor ejemplo
y más grande inspiración.*

Agradecimientos

A la directora y gestora de este trabajo, a la Dra. Marylin Hidalgo, por involucrarme en él y abrirme las puertas de la Rickettsiología.

Al Dr. Jesús Alfredo Cortés Vecino, por su apoyo incondicional en todas las fases de este trabajo y por abrirme las puertas de la Parasitología y Entomología Veterinaria.

A la Dra. Patricia Escandón, al Dr. Jaime Moreno y a todo el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud por ser una gran escuela y por permitir el desarrollo de los procesos en el Laboratorio. A la Dra. Eliana Parra y al Dr. Elkin Hernández, por ser pacientes tutores en los campos de la Biología Molecular.

Al Dr. Juan David Rodas y al Dr. Andrés Felipe Londoño de la Universidad de Antioquia, por facilitar los recursos y dar soporte permanente al desarrollo de este estudio.

A la Dra. Claudia Cuervo por su asesoría paciente en los campos de la Bioinformática y Filogenia.

Al recurso humano del Grupo y Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, quienes fueron y han sido un soporte esencial desde el inicio a la culminación de este trabajo.

Al recurso humano del Laboratorio de Bacteriología Especial de la Pontificia Universidad Javeriana, con los cuales se ha recorrido los caminos de la Rickettsiología.

A los compañeros de lucha de la Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico por aportar conocimientos y experiencias invaluableles en este trasegar.

Al recurso humano de la Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico y a la Universidad Nacional de Colombia por permitirme seguir ***encontrando la verdad entre sus aulas.***

Resumen.

Las Rickettsiosis son enfermedades emergentes zoonóticas asociadas a artrópodos. Éstas son producidas por la infección de bacterias del género *Rickettsia* (Da Rocha-Lima, 1916) las cuales son alfa-proteobacterias que se caracterizan por ser parásitos intracelulares obligados y porque pueden desencadenar enfermedad febril inespecífica en humanos y animales, las cuales, si no son diagnosticadas y tratadas de forma oportuna pueden tener un desenlace fatal. En su ciclo biológico, las rickettsias dependen de un vector que permita su transmisión a hospederos susceptibles o su mantenimiento en la naturaleza. Las garrapatas juegan un rol esencial al ser los principales vectores y reservorios de múltiples especies en diferentes regiones geográficas. En Colombia, los primeros reportes de la enfermedad datan de la primera mitad del siglo XX (1937) cuando el Dr. Luis Patiño Camargo (1871-1978), quién describió una entidad a la que denominó la “Fiebre de Tobia”, una enfermedad que impactó esta población por sus altos niveles de morbi-mortalidad. Después de casi 70 años de desconocimiento u olvido, reinicia la preocupación por estas entidades debido a los brotes y fallecimientos presentados en los departamentos de Antioquia, Córdoba y Cundinamarca durante los años 2005 a 2008. Aún se desconocen múltiples aspectos de la epidemiología de la enfermedad en nuestro medio, como los reservorios vertebrados, los posibles hospederos de amplificación, las especies de la bacteria circulantes y los posibles vectores involucrados en la transmisión, entre otros. El presente trabajo tuvo como objetivo, identificar molecularmente especies de *Rickettsia* y establecer sus relaciones filogenéticas, en muestras de garrapatas colectadas entre los años 2005 a 2008, en 3 regiones de Colombia. 791 garrapatas fueron colectadas en los municipios de Los Córdoba (Córdoba); Necoclí y Turbo (Antioquia) y Villeta y La Peña (Cundinamarca). Se procesaron en pools para la extracción de DNA. Las muestras fueron analizadas para el género *Rickettsia* a través de la amplificación de los genes *gltA*, *ompB* y *17kD*. Las muestras positivas a la amplificación fueron secuenciadas para posterior análisis de homología e identificación de la especie

correspondiente. Se analizaron 240 pools de garrapatas de las especies *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), *R. (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) y *Amblyomma* sp. Un total de 15 muestras fueron positivas al gen *gltA* (6,3%) provenientes de los municipios de Villeta (47%), La Peña (47%) y Turbo (50%). Se recuperaron dos secuencias del Municipio de Villeta, de garrapatas *D. nitens*, que presentaron homología con *Rickettsia* spp. Una de ellas, de 99% para *R. rickettsii* con el gen *17kD* y la segunda de 99% para *R. felis* con el gen *gltA*. Los análisis de relación filogenética realizados con los métodos Neighbor-Joining, Maximum Likelihood y Maximum Parsimony localizaron a la primera muestra en el grupo de especies de las Fiebres Manchadas (bootstrap >86%) y a la segunda en un conglomerado con aislamientos de *R. felis* (bootstrap, 99%). El presente estudio, corrobora la presencia de bacterias del género *Rickettsia*, de una especie del Grupo de las Fiebres Manchadas y de *R. felis*, en garrapatas asociadas a los brotes de Rickettsiosis presentados en el Municipio de Villeta (Cundinamarca). Además, se amplifica por primera vez DNA de *Rickettsia* en garrapatas del Municipio de La Peña (Cundinamarca) donde se han presentado indicios de casos clínicos compatibles.

Palabras clave: *Rickettsia*, Garrapatas, Colombia, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Filogenia.

Abstract.

Rickettsioses are zoonotic emergent diseases associated with arthropods. They are related with bacteria from the genus *Rickettsia* (Da Rocha-Lima, 1916) which are obligate intracellular Alphaproteobacteria. They can cause febrile illness in humans and animals and, if they are not properly treated and diagnosed, could lead to a fatal outcome. In their biological cycle, these bacteria depend on arthropod vectors for transmission to susceptible hosts and for maintenance in natural conditions. Ticks are essential for some *Rickettsia* species as they could be

the primary vectors and reservoirs in different geographical zones. In Colombia, the first reports dated from the first half of the XX century (1937), when Dr. Luis Patiño Camargo (1871-1978) described what he called “Fiebre de Tobia”, a lethal disease that affected this population with high levels of morbidity and mortality. Almost 70 years later, after a long period of unawareness, some outbreaks and fatal cases in the Departments of Antioquia, Cordoba and Cundinamarca, between 2005 and 2008, renewed the general concern. However, some epidemiological aspects of these diseases require further research. The vertebrate hosts included in the cycles, possible amplifier hosts, circulating *Rickettsia* species, possible arthropod vectors, are some examples. The aim of the present work was identify by molecular methods, *Rickettsia* species and find out their phylogenetic relationship, in samples of ticks collected between 2005 and 2008 in three geographical regions from Colombia. A total of 791 ticks were collected in the municipalities of Los Cordobas (Cordoba); Necocli and Turbo (Antioquia); and Villeta and La Peña (Cundinamarca). DNA was extracted by pools of ticks, and further analyzed by PCR to amplify the *Rickettsia* genes *gltA*, *ompB* and *17kD*. PCR positive samples were sequenced and the resultant sequences were compared to find homologies. 240 pools of ticks from the species *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), *R. (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) and *Amblyomma* sp. were analyzed. 15 samples were positive to *gltA* (6.3%) and correspond to Villeta (47%), La Peña (47%) and Turbo (50%). Two sequences of *D. nitens* pools from Villeta, had homology with *R. rickettsii* (99%, *17kD* gene) and *R. felis* (99%, *gltA* gene). Phylogenetic analyses using Neighbor-Joining, Maximum Likelihood and Maximum Parsimony methods locate the first sample with other Spotted Fever Group (SFG) species (bootstrap >86%) and the second in a clade with different isolates of *R. felis* (bootstrap, 99%). This study, confirms the presence of *Rickettsia* species (an SFG species and *R. felis*), in ticks collected in the outbreaks presented in Villeta (Cundinamarca). Besides, herein it is amplified

for the first time, *Rickettsia* DNA in ticks collected from La Peña (Cundinamarca) which had compatible clinical cases.

Key words: *Rickettsia*, Ticks, Colombia, Polymerase Chain Reaction, Phylogeny.

Contenido.

	Pág.
Resumen.	X
Abstract.	XI
Contenido.	XIII
Lista de Figuras.	XVI
Lista de Tablas.	XVIII
1. Capítulo 1. Rickettsiosis Transmitidas por Garrapatas: una	
Aproximación al Estado del Arte.	1
1.1. Género <i>Rickettsia</i> .	1
1.1.1. Introducción.	1
1.1.2. Bacteriología.	2
1.1.3. Filogenia.	3
1.1.4. Taxonomía.	8
1.2. Garrapatas.	15
1.2.1. Biología.	15
1.2.2. Distribución.	17
1.2.3. Enfermedades Transmitidas por Garrapatas.	19
1.3. Rickettsiosis Transmitidas por Garrapatas.	21
1.3.1. Interacción Garrapata- <i>Rickettsia</i> .	21
1.3.2. <i>Rickettsia rickettsii</i> (Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas-RMSF).	29
1.3.2.1. Etiología.	29
1.3.2.2. Distribución.	30
1.3.2.3. Transmisión.	30
1.3.2.4. Impacto en Salud Pública.	34
1.3.2.5. Presentación Clínica en Humanos.	36
1.3.2.6. Presentación Clínica en Animales.	37
1.3.3. <i>Rickettsia parkeri</i> .	38

1.3.4. Otras Especies de <i>Rickettsia</i> Transmitidas por Garrapatas.	40
1.4. Rickettsiosis en Colombia.	46
2. Capítulo 2. Objetivo específico 1: Identificación Molecular de Bacterias del Género <i>Rickettsia</i> en Muestras de DNA de Garrapatas Obtenidas en Diferentes Municipios de Antioquia, Córdoba y Cundinamarca Mediante PCR con el Uso de Iniciadores Específicos (Primers).	51
2.1. Descripción del Objetivo.	51
2.2. Materiales y Métodos.	51
2.2.1. Garrapatas.	51
2.2.2. Extracción de DNA.	52
2.2.3. Medición de Concentración y Pureza.	54
2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	54
2.2.5. Secuenciación de Ácidos Nucléicos.	56
2.2.6. Análisis de Secuencias.	57
2.3. Resultados.	57
2.3.1. Garrapatas.	57
2.3.2. Detección Molecular.	61
2.3.3. Secuenciación.	65
2.4. Discusión.	65
3. Capítulo 3. Objetivo Específico 2: Establecer Relaciones Filogenéticas entre las Especies de <i>Rickettsia</i> Identificadas.	70
3.1. Descripción del Objetivo.	70
3.2. Materiales y Métodos.	70
3.2.1. Secuencias.	70
3.2.2. Análisis de Relación Filogenética.	71
3.3. Resultados.	72
3.3.1. Análisis de Relación Filogenética con el Gen <i>17kD</i> .	72
3.3.2. Análisis de Relación Filogenética con el Gen <i>gltA</i> .	73

3.4. Discusión.	74
4. Capítulo 4. Conclusiones y Recomendaciones.	84
4.1. Conclusiones.	84
4.2. Recomendaciones.	85
Anexos.	87
Bibliografía.	113

Lista de Figuras.

	Pág.
Figura 1. <i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i> al interior de una célula endotelial humana (flechas). Tinción de Giménez.	3
Figura 2. Organización filogenética de especies de <i>Rickettsia</i> basada en la comparación de secuencias del gen <i>16S rRNA</i> .	4
Figura 3. Organización filogenética de especies de <i>Rickettsia</i> basada en la comparación de secuencias del gen <i>gltA</i> .	4
Figura 4. Organización filogenética de especies de <i>Rickettsia</i> basada en la comparación de secuencias del gen <i>ompA</i> .	6
Figura 5. Organización filogenética de especies de <i>Rickettsia</i> basada en la comparación de secuencias del gen <i>ompB</i> .	6
Figura 6. Organización filogenética de especies de <i>Rickettsia</i> basada en la comparación de secuencias del gen <i>sca4</i> .	8
Figura 7. Guía para la clasificación taxonómica en el género <i>Rickettsia</i> . Genes: <i>rrs</i> , codifica el gen <i>16S rDNA</i> ; <i>gltA</i> , codifica la enzima Citrato Sintetasa; <i>ompA</i> , codifica la proteína rOmpA; <i>ompB</i> , codifica la proteína rOmpB; <i>sca4</i> codifica Sca4.	14
Figura 8. Especies de <i>Rickettsia</i> detectadas en garrapatas en América.	43
Figura 9. Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining (distancia-P) basado en secuencias parciales del gen <i>17kD</i> y que evidencia la posición de la secuencia VP8 (flecha) entre especies del género <i>Rickettsia</i> .	78
Figura 10. Árbol filogenético construido por el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei y en secuencias parciales del gen <i>17kD</i> , que evidencia la posición de la secuencia VP8 (flecha) entre especies del género <i>Rickettsia</i> .	79
Figura 11. Árbol filogenético construido por el método de Maximum Parsimony basado en secuencias parciales del gen <i>17kD</i> y que	

- evidencia la posición de la secuencia VP8 (flecha) entre especies del género *Rickettsia* 80
- Figura 12.** Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining (distancia-P) basado en secuencias parciales del gen *gltA* y que evidencia la posición de la secuencia VP25 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. 81
- Figura 13.** Árbol filogenético construido por el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei y en secuencias parciales del gen *gltA*, que evidencia la posición de la secuencia VP25 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. 82
- Figura 14.** Árbol filogenético construido por el método de Maximum Parsimony basado en secuencias parciales del gen *gltA*, que evidencia la posición de la secuencia VP25 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. 83

Lista de Tablas.

	Pág.
Tabla 1. Posición taxonómica del género <i>Rickettsia</i> .	9
Tabla 2. Características generales de especies validadas del género <i>Rickettsia</i> .	12
Tabla 3. Número de especies de garrapatas encontradas en Colombia, en Latinoamérica y en el mundo.	17
Tabla 4. Géneros y número de especies de garrapatas reportadas en Colombia.	19
Tabla 5. Principales enfermedades transmitidas por garrapatas en humanos.	23
Tabla 6. Principales enfermedades transmitidas por garrapatas en animales.	24
Tabla 7. Especies de <i>Rickettsia</i> asociadas a garrapatas identificadas en América.	44
Tabla 8. Secuencias de iniciadores incluidos en el proceso de identificación molecular.	55
Tabla 9. Géneros y especies de garrapatas incluidas en el proceso de identificación molecular de <i>Rickettsia</i> spp.	58
Tabla 10. Pools conformados por origen geográfico (Municipio y Departamento).	59
Tabla 11. Pools de garrapatas conformados por origen (hospedero, animal o casa/domicilio).	60
Tabla 12. Pools de garrapatas conformados por estadio del ciclo de vida.	60
Tabla 13. Pools de garrapatas positivos a los genes <i>16S rRNA mit</i> , <i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>17kD</i> , por origen geográfico.	61
Tabla 14. Pools de garrapatas positivos a los genes <i>16S rRNA mit</i> , <i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>17kD</i> , por especie.	63
Tabla 15. Pools de garrapatas positivos a los genes <i>16S rRNA mit</i> ,	

<i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>17kD</i> , por origen de recolección.	63
Tabla 16. Pools de garrapatas positivos a los genes <i>16S rRNA mit</i> , <i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>17kD</i> , por estadio.	64
Tabla 17. Pools de garrapatas positivos a los genes <i>16S rRNA mit</i> , <i>gltA</i> , <i>ompB</i> y <i>17kD</i> , por sexo.	64
Tabla 18. Muestras de garrapatas incluidas en el proceso de secuenciación de especies de <i>Rickettsia</i> .	69

1. **Capítulo 1.** Rickettsiosis Transmitidas por Garrapatas: una Aproximación al Estado del Arte.

1.1. Género *Rickettsia*.

1.1.1. Introducción.

El término “rickettsia”, asignado antiguamente a cualquier bacteria que no pudiese ser cultivada en condiciones de laboratorio y por lo tanto, de difícil identificación, ha cambiado a través de los años. Hoy, gracias a los aportes de diferentes técnicas moleculares se ha mejorado el entendimiento de las relaciones filogenéticas y la posición taxonómica de las diversas especies. Actualmente, este término se aplica únicamente a bacterias pertenecientes al género *Rickettsia*, que a su vez pertenecen a la familia Rickettsiaceae, al orden Rickettsiales y a la clase Alphaproteobacteria (1).

Al hacer un breve recuento histórico de este microorganismo y las enfermedades asociadas al mismo, es necesario remontarse a registros del siglo V a.C. que indican que el Tifo Epidémico pudo ser el responsable de múltiples muertes durante “La Plaga” de Atenas. Luego, sólo hasta el siglo XVI de nuestra era, es reconocida esta enfermedad debido a la identificación clínica de exantema en pacientes febriles considerados como tifoideos (2). En 1909, Charles Nicolle describe la importancia del “Piojo del Cuerpo” (*Pediculus humanus humanus*, Linnaeus, 1758) en la transmisión del Tifo Epidémico y para la misma época, gracias a los trabajos de Ricketts y von Prowazek, se puede aislar la bacteria por primera vez (3).

La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (Rocky Mountain Spotted Fever o RMSF, por sus siglas en inglés) fue descrita por primera vez hacia 1896, cuando Edward E. Maxey, realizó la primera caracterización clínica de lo que denominó la “Fiebre Manchada de Idaho”. En 1904, Louis B. Wilson y William M. Chowning concluyen que garrapatas del género

Dermacentor eran responsables de la transmisión de la bacteria. Posteriormente, entre los años 1906 y 1910, el médico y microbiólogo estadounidense, Howard Taylor Ricketts, aísla el agente etiológico, identifica el ciclo silvestre de la enfermedad, la reproduce de forma experimental en cobayos y primates, y confirma la transmisión transovárica de la bacteria en garrapatas. Estos estudios fueron complementados por S. Burt Wolbach quien en 1919 reportó la naturaleza intracelular de la bacteria y su afinidad por las células endoteliales (3-5).

1.1.2. Bacteriología.

Las bacterias pertenecientes al género *Rickettsia* 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 (pared celular) y una capa de glicocálix (*slime*) que las rodea al interior de la célula hospedera. Las rickettsias no tiñen con la coloración de Gram pero sí con la coloración de Giménez, que usa fucsina básica y permite observarlas de un color rojo tenue en medio de un fondo azul claro dado por el contraste del verde de malaquita (Figura 1)(1, 6, 7).

A partir de diferentes características biológicas, el género *Rickettsia* se ha subdividido en el Grupo de las Fiebres Manchadas (SFG) y en el Grupo del Tifo (TG). El grupo SFG se caracteriza por: estar asociado principalmente a garrapatas, aunque también a pulgas (*R. felis*) y ácaros (*R. akari*); tener una temperatura óptima de crecimiento de 32°C y moverse dentro y entre células hospederas debido a su capacidad de polimerizar la actina, lo que le permite localizarse también en el núcleo. El Grupo del Tifo (TG) se relaciona con el piojo humano (*R. prowazekii*) o con pulgas (*R. typhi*); su temperatura óptima de crecimiento son los 35°C y no polimeriza la actina restringiendo así su localización al citoplasma (1).

1.1.3. Filogenia

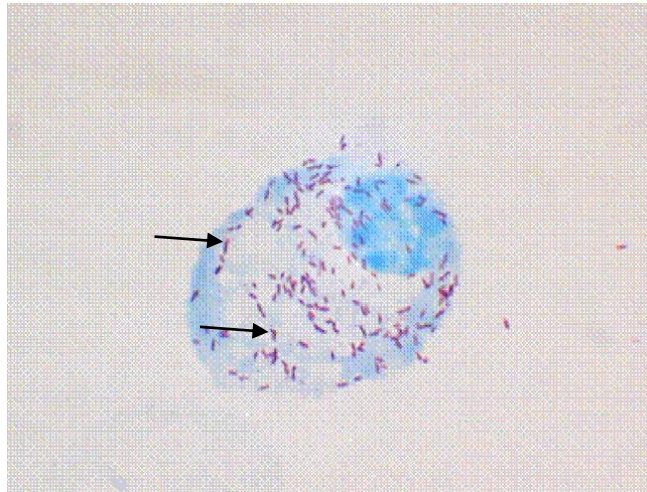


Figura 1. *Rickettsia conorii* subsp. *conorii* al interior de una célula endotelial humana (flechas). Tinción de Giménez. Fuente: 6.

En los estudios filogenéticos de *Rickettsia* se usaban inicialmente características antigénicas, morfológicas y metabólicas, las cuales eran poco sensibles. Posteriormente, con el advenimiento de herramientas moleculares, con técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) y secuenciación de ácidos nucleicos, pudieron iniciarse análisis de relaciones filogenéticas más confiables (1).

El primer gen usado en los análisis filogenéticos fue el *16S rRNA*. Su uso permitió un gran avance para los estudios filogenéticos y taxonómicos dentro de este género. Gracias a este pudieron ser reclasificados géneros de bacterias ubicados en el orden Rickettsiales como *Coxiella*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Bartonella*, *Rochalimaea* y *Grahamella*, en otros órdenes, familias e incluso clases. Además, la antigua bacteria *Rickettsia tsutsugamushi*, agente etiológico del denominado “Tifo de los Matorrales” (Scrub-Typhus), pudo ser diferenciada lo suficiente como para ser reclasificada dentro de un nuevo género: *Orientia* con una única especie *Orientia tsutsugamushi* (8, 9).

Los análisis de filogenia con el gen 16S RNA permiten identificar secuencias específicas para cada serotipo de *Rickettsia* aunque también arrojan altos niveles de similitud entre éstas (99,9). Es decir, este gen permite confirmar la unidad evolutiva del género, pero dificulta las inferencias de filogenia dentro del mismo (10). Los estudios hechos con éste permiten identificar el Grupo de las Fiebres Manchadas (SFG) donde se agrupan la mayoría de especies y el del Tifo (TG) con las especies *R. typhi* y *R. prowazekii*; por otro lado, evidencia la separación de las especies *R. canadensis* y *R. bellii* en un clado diferente, ramificado antes de la separación evolutiva de los grupos TG y SFG, lo que los agrupa en el denominado Grupo Ancestral (AG) (Figura 2) (10-12).

Otros estudios recientes, basados en estudios genómicos de la especie *R. felis*, han propuesto la conformación adicional de un Grupo Transicional

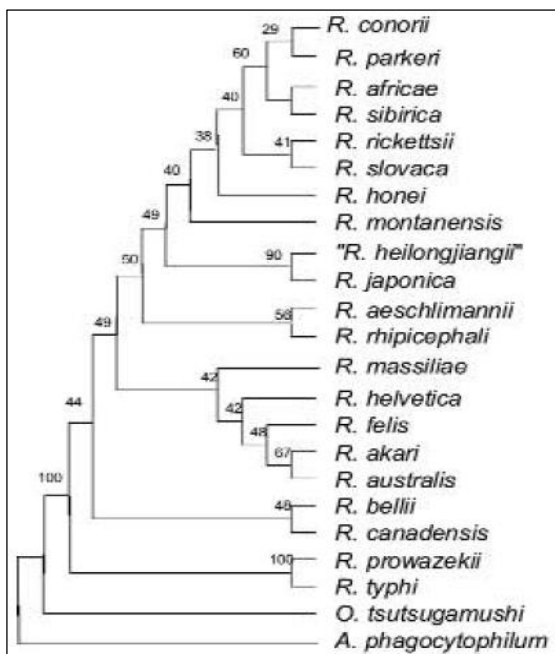


Figura 2. Organización filogenética de especies de *Rickettsia* basada en la comparación de secuencias del gen 16S rRNA. Fuente: 1.

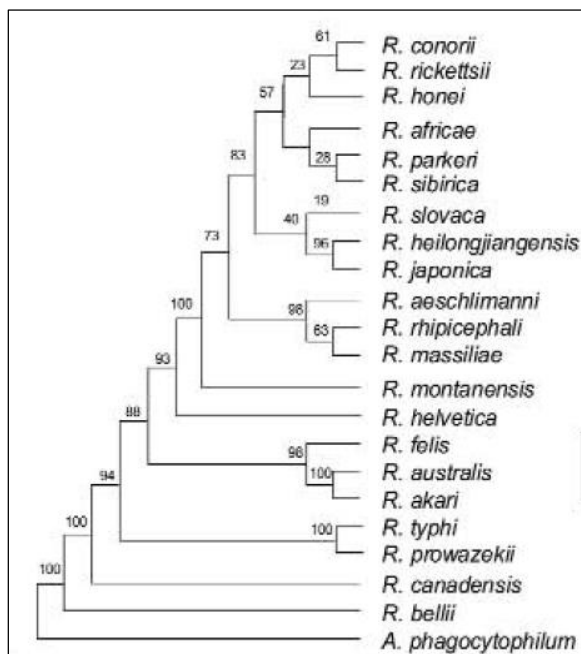


Figura 3. Organización filogenética de especies de *Rickettsia* basada en la comparación de secuencias del gen *gltA*. Fuente: 1.

(TRG) donde se incluirían las especies *R. felis* y *R. akari*, las cuales comparten características biológicas con los grupos SFG y AG (13).

Debido a las limitaciones del gen *16S RNA* para hacer una diferenciación dentro del género, comenzaron a usarse otros genes entre los que se incluyen, *gltA*, que codifica para la enzima Citrato Sintetasa; el gen de la proteína de 17 kD y los genes de la familia de autotransportadores *sca*: *ompA*, *ompB*, *sca4*, *sca1* y *sca2* (8).

Las relaciones filogenéticas inferidas a partir del gen *gltA* permiten adecuadas diferenciaciones y valores bootstrap (relacionados con la significancia de la relación establecida), para todos los nodos con excepción de aquellos incluidos dentro del grupo SFG. Trabajos de análisis con este gen permiten diferenciar cuatro conglomerados de especies dentro de éste grupo. El primero es el de *R. rickettsii* donde se incluyen las especies: *R. conorii*, *R. honei*, *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. slovacae*, *R. japonica*, *R. peacockii* y *R. heilongjiangensis*; el segundo es el de *R. massiliae* que incluye *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. montanensis*, *R. aeschlimannii* y *R. raoultii*; el tercero es el de *R. akari* con las especies *R. akari*, *R. felis* y *R. australis* y por último, el conglomerado de *R. helvetica* con *R. helvetica*, *R. asiatica* y *R. tamurae*. Similar a lo hallado con el gen *16S rRNA*, las especies *R. canadensis* y *R. bellii* forman un conglomerado aparte del grupo SFG y TG en una ramificación evidente (Figura 3) (8, 14).

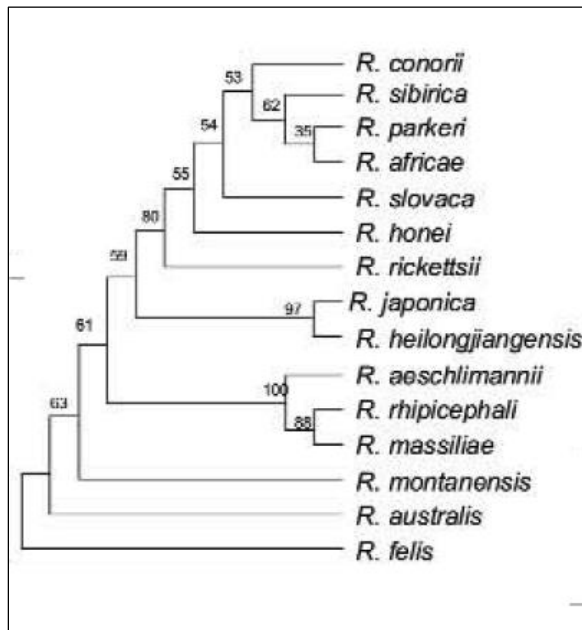


Figura 4. Organización filogenética de especies de *Rickettsia* basada en la comparación de secuencias del gen *ompA*. Fuente: 1.

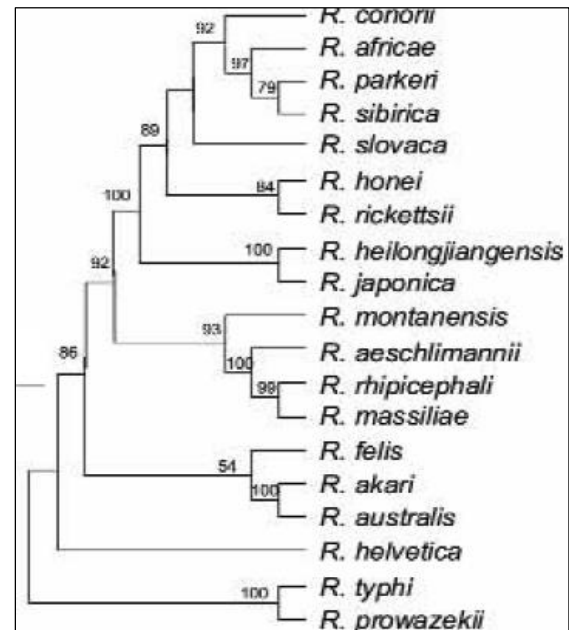


Figura 5. Organización filogenética de especies de *Rickettsia* basada en la comparación de secuencias del gen *ompB*. Fuente: 1.

La utilización del gen *ompA* permite hacer una mejor diferenciación de las especies incluidas en el conglomerado de *R. rickettsii* ya que esta especie y las especies *R. honei* y *R. slovaca* no se agrupan con ninguna otra en los cladogramas. Los estudios de filogenia con este gen identifican además otros tres conglomerados dentro del grupo SFG: *R. conorii*, *R. africae* (donde se incluye: *R. parkeri* y *R. sibirica*) y *R. massiliae* (donde se incluye: *R. montanensis*, *R. aeschlimannii* y *R. rhipicephali*). Este gen además, permite obtener adecuados valores bootstrap para todas las especies exceptuando la especie *R. honei*. Cabe resaltar por otro lado, que el gen *ompA* no puede ser amplificado para las especies del Grupo del Tifo y otras como *R. helvetica*, *R. akari*, *R. canadensis* y *R. bellii* (Figura 4) (8, 15).

Los análisis de filogenia basados en las secuencias del gen *ompB* permiten corroborar los hallazgos de los genes *gltA* y *ompA*. Con éste pueden incluirse en los análisis las especies del grupo TG y las demás especies del SFG exceptuando *R. bellii* y *R. canadensis*. La separación del grupo TG es

evidente y dentro de las especies del grupo SFG pueden identificarse cuatro conglomerados. El primero donde se agrupan *R. akari*, *R. felis* y *R. australis*; el segundo donde *R. helvetica* se separa; el tercero con las especies *R. montanensis*, *R. aeschlimannii*, *R. rhipicephali* y *R. massiliae*; y un último con las especies *R. honei* y *R. rickettsii* en un subgrupo, *R. africae*, *R. parkeri* y *R. sibirica* en otro y *R. conorii* en un último subgrupo. La especie *R. slovacae* no se agrupa con ningún otro conglomerado y según estudios con este gen los valores bootstrap son bajos (<60) para las especies *R. parkeri* y *R. africae* (Figura 5) (8, 16).

El gen que codifica para la proteína de 17 kD no ha sido usado para los análisis de filogenia debido a los bajos valores bootstrap para la mayoría de los nodos (8). Estudios realizados con este gen permitieron evidenciar diferencias entre las especies del grupo TG y del SFG (*R. rickettsii* y *R. conorii*) pero no pudieron discriminar adecuadamente las especies dentro de este último (17).

El gen *sca4* permite diferenciar 2 grupos filogenéticos: el grupo TG y los conglomerados de las especies del grupo SFG: *R. rickettsii*, *R. massiliae*, *R. helvetica* y *R. akari* (Figura 6). Por último, los genes *sca1* y *sca2*, que también han sido usados en algunos análisis filogenéticos, evidencian agrupamientos muy similares a los registrados con los genes *ompA*, *ompB* y *sca4* (1, 8).

Adicional a los genes mencionados, algunos espaciadores intergénicos han evidenciado potencial para ser usados en estudios filogenéticos de esta

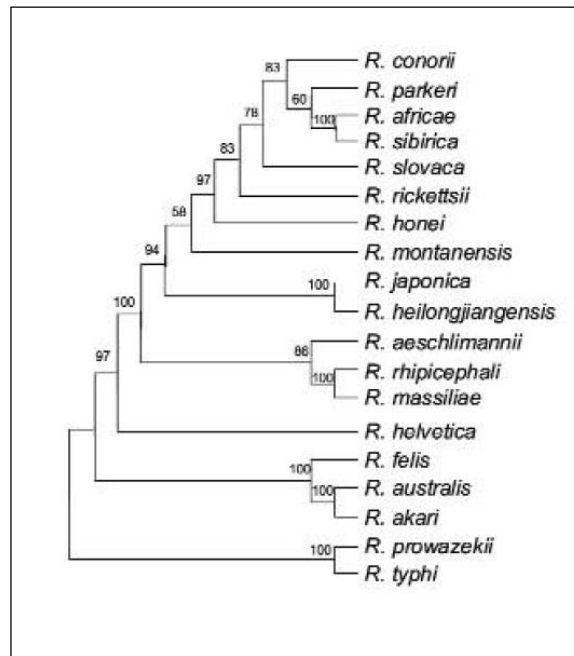


Figura 6. Organización filogenética de especies de *Rickettsia* basada en la comparación de secuencias del gen *sca4*. Fuente: 1.

especie. Un estudio hecho por Fournier y col. en el año 2007, demostró resultados muy similares a los obtenidos con secuencias génicas, diferenciando especies e incluso cepas dentro de algunas de estas; demostrando como las secuencias intergénicas conservan, en cierto grado, la presión de selección (18).

1.1.4. Taxonomía.

La clasificación taxonómica de las bacterias pertenecientes al género *Rickettsia* y de otras bacterias intracelulares relacionadas, ha sufrido cambios evidentes en las últimas 3 décadas gracias al advenimiento de técnicas moleculares avanzadas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación de ácidos nucleicos (6, 8). En la Tabla 1 se resume la posición taxonómica actual del género *Rickettsia*.

Dentro del orden Rickettsiales inicialmente eran incluidas las familias Anaplasmataceae, Rickettsiaceae y Bartonellaceae, no obstante, gracias al uso de marcadores moleculares como el gen *16S rRNA*, esta última familia fue reclasificada quedando las dos primeras como miembros actuales del orden. Gracias al uso de este gen, también pudieron reclasificarse múltiples géneros dentro de las primeras dos familias, con lo cual la familia Anaplasmataceae agrupa actualmente los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Aegyptianella*, *Wolbachia* y *Neorickettsia* y por su parte la familia Rickettsiaceae los géneros *Rickettsia* y *Orientia* (1, 19).

Tabla 1. Posición taxonómica del género *Rickettsia*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alfaproteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Rickettsiaceae
Género	<i>Rickettsia</i>

Fuente: (8, 19, 20).

La identificación a nivel de especie ha generado grandes dificultades a los expertos en este grupo de bacterias intracelulares. Previo al desarrollo de herramientas moleculares, algunas características fenotípicas ayudaron a la diferenciación inicial de los diversos grupos de especies a través de criterios como la localización intracelular, la temperatura óptima de crecimiento en cultivos celulares y la reacción cruzada de sueros de pacientes con antígenos somáticos específicos. Otros aspectos han ayudado a la descripción general de especies; la localización geográfica; el artrópodo vector; la patogenicidad en humanos, ratones y cobayos; el tamaño del bacilo; el tiempo de formación de placas en cultivos monocapa; la actividad hemolítica; la inmunidad cruzada; las pruebas vacunales en cobayos; la fijación de complemento y la neutralización de toxinas, son algunos ejemplos (1).

Métodos como la serotipificación en ratones, para las especies del grupo SFG o la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) han sido útiles en la diferenciación de especies aunque con algunas limitaciones (8).

Después de los desarrollos en las herramientas de biología molecular, los criterios de identificación molecular de aislamientos aplicados a la gran mayoría de aislamientos bacterianos, para su ubicación dentro de una especie, como el porcentaje de hibridación DNA-DNA (>70%), el porcentaje de contenido de G+C (<5%) y la divergencia en el gen 16S rRNA (<3%) o la identidad promedio de nucleótidos (ANI), no pudieron ser aplicados al género *Rickettsia* ya que sus resultados fueron contradictorios y agruparon especies que ya habían sido diferenciadas. No obstante, metodologías como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación del género y ulteriores herramientas como el ensayo de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) o la secuenciación de ácidos nucleicos, que permiten llegar a especie, han sido de gran utilidad en los procesos de identificación taxonómica de estas bacterias. Los genes comúnmente amplificados y secuenciados en estos procesos de identificación son 16S rRNA, *gltA*, 17kD, *ompA*, *ompB*, *sca1*, *sca2* y *sca4* (8).

La definición de una especie dentro del género *Rickettsia* ha sido motivo de diversos debates debido a la falta de normas oficiales. La ausencia de características fenotípicas específicas, ha dificultado la aplicación de las guías de clasificación de bacterias extracelulares. En la actualidad diversas características genotípicas, fenotípicas y filogenéticas son usadas para la definición de una especie y gracias al acuerdo de un comité internacional de expertos fue propuesta en el año 2005, una guía polifásica para la clasificación de aislamientos de *Rickettsia* a diferentes niveles taxonómicos, con el fin de aclarar la nomenclatura dentro del género (Figura 7) (1, 8).

Actualmente son reconocidas 28 especies dentro del género (Tabla 2), aunque múltiples aislamientos y genotipos aún están pendientes de clasificación.

De algunas especies descritas se han obtenido aislamientos con características fenotípicas específicas; esto ha llevado a la aceptación del taxón subespecie para algunos casos como ocurre con el complejo de subespecies de *R. conorii* y *R. sibirica* ([21](#), [22](#)). Adicionalmente, otras herramientas moleculares como MST (Multi-Spacer Typing) han permitido la diferenciación de genotipos entre diversos aislamientos de una misma especie de *Rickettsia*, a través de la amplificación de secuencias intergénicas (no codificantes)([18](#), [23](#)).

Tabla 2. Características generales de especies validadas del género *Rickettsia*.

Especie	Subespecie	Distribución geográfica	Enfermedad asociada
<i>R. aeschlimannii</i>		Francia, Marruecos	Fiebre Manchada sin nombre
<i>R. africae</i>		África Sub-Sahariana, Isla Reunión, Antillas y Bahamas	Fiebre Africana Transmitida por Garrapatas (African Tick-Bite Fever)
<i>R. akari</i>		Estados Unidos	Viruela Rickettsiósica (Rickettsialpox)
<i>R. amblyommii</i>		Estados Unidos, Costa Rica, Brasil y Argentina	Fiebre Manchada sin nombre
<i>R. asiatica</i>		Japón	Desconocida
<i>R. australis</i>		Australia	Tifo de Garrapatas de Queensland (Queensland Tick Thyphus)
<i>R. bellii</i>		Estados Unidos, Brasil, Argentina	Desconocida
<i>R. canadensis</i>		Estados Unidos	Desconocida
<i>R. conorii</i>	<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	Mediterráneo Europeo, África	Fiebre Manchada del Mediterráneo (Mediterranean Spotted Fever-MSF)
	<i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i>	India	Tifo de Garrapatas de la India (Indian Tick Thyphus)
	<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	Chad, Kosovo, Rusia	Fiebre de Astrakhan (Astrakhan Fever)
	<i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	Israel	Fiebre Manchada Israelí (Israeli Spotted Fever)
<i>R. felis</i>		Mundial	Fiebre Manchada por Pulgas (Flea Spotted Fever)
<i>R. heilongjiangensis</i>		China, Rusia, Tailandia	Rickettsiosis del Lejano Este (Far Eastern Rickettsiosis)
<i>R. helvetica</i>		Europa, Japón	Agente sospechoso de Rickettsiosis
<i>R. honei</i>		Australia	Fiebre Manchada de las Islas Flinders (Flinders Island Spotted Fever)
<i>R. japonica</i>		Japón	Fiebre Manchada Oriental o Japonesa (Oriental or Japanese Spotted Fever)

Tabla 2. Continuación.

Especie	Subespecie	Distribución geográfica	Enfermedad asociada
<i>R. massiliae</i>		Francia, Argentina	Fiebre Manchada similar a MSF
<i>R. monacensis</i>		Europa, Norte de África	Fiebre Manchada similar a MSF
<i>R. montanensis</i>		Estados Unidos	Desconocida
<i>R. parkeri</i>		Estados Unidos	Rickettsiosis sin nombre
<i>R. peacockii</i>		Estados Unidos	Desconocida
<i>R. prowazekii</i>		África, Rusia, Suramérica	Tifo Epidémico (Epidemic Typhus)
<i>R. raoultii</i>		Francia, Rusia	TIBOLA o DEBONEL
<i>R. rhipicephali</i>		África, Europa, Estados Unidos, Brasil	Desconocida
<i>R. rickettsii</i>		América	Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas; Fiebre de Tobia (Rocky Mountain Spotted Fever; Febre Maculosa Brasileira)
<i>R. rioja</i>		España	TIBOLA o DEBONEL
<i>R. sibirica</i>	<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	China, Rusia	Tifo de Garrapatas de Siberia o del Norte de Asia (Siberian or North Asian Tick Typhus)
	<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimona</i>	Algeria, China, Francia, Grecia, Sudáfrica	Rickettsiosis Asociada a Linfangitis
<i>R. slovacae</i>		Europa, Rusia	TIBOLA o DEBONEL
<i>R. tamurae</i>		Japón	Desconocida
<i>R. typhi</i>		Mundial	Tifo Murino (Murine Typhus)

Fuente: (1, 8, 24, 25).

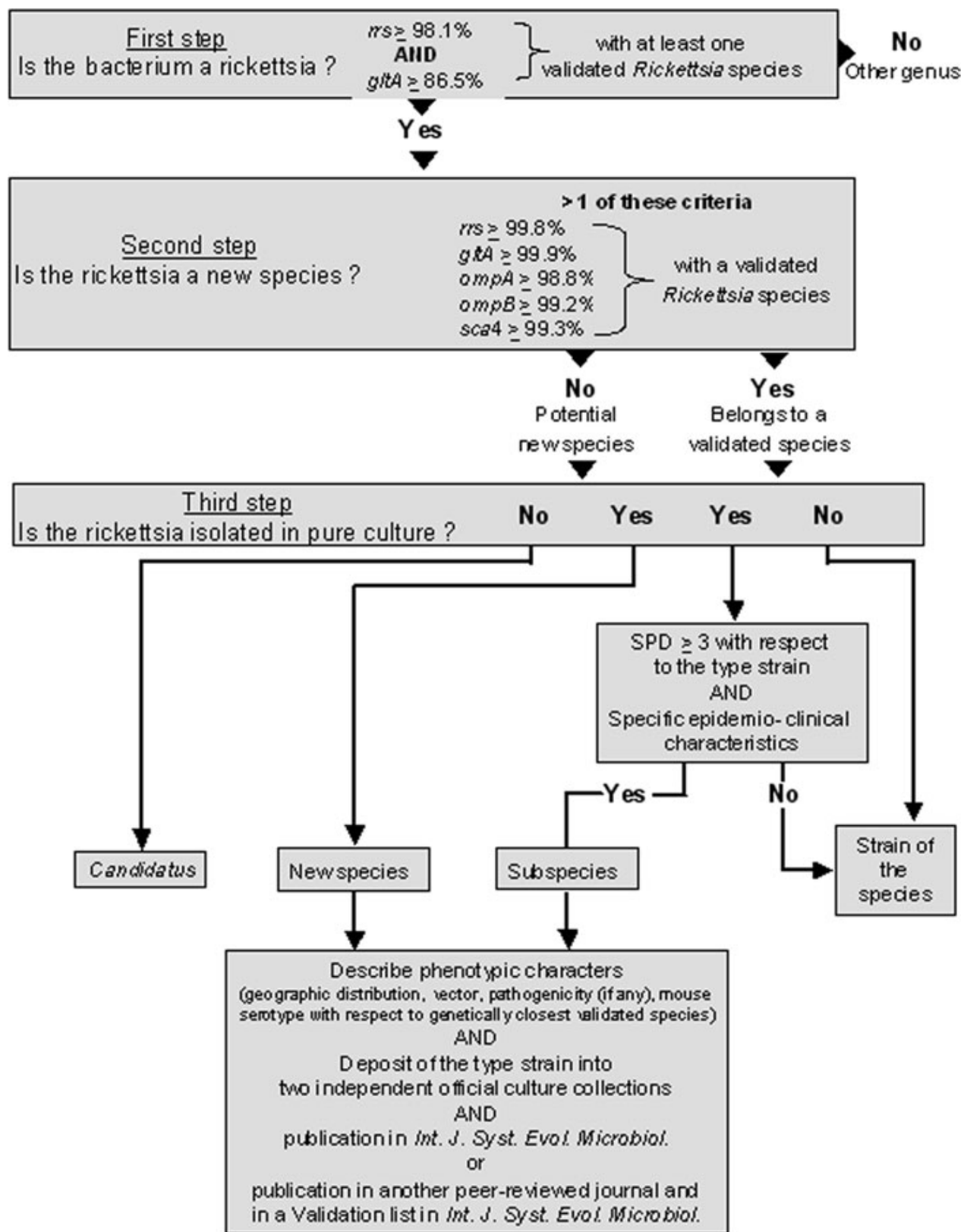


Figura 7. Guía para la clasificación taxonómica en el género *Rickettsia*. Genes: *rrs*, codifica el gen *16S rDNA*; *gltA*, codifica la enzima Citrato Sintetasa; *ompA*, codifica la proteína rOmpA; *ompB*, codifica la proteína rOmpB; *sca4* codifica Sca4. SPD = diferencias específicas en serotipificación en ratones. Fuente: 8.

1.2. Garrapatas.

1.2.1. Biología.

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos principalmente de climas medios y cálidos, prácticamente de todos los vertebrados terrestres, principalmente de mamíferos, aves, reptiles y algunos anfibios; aunque son parásitos cosmopolitas, numerosas especies están restringidas en hábitats específicos ([26](#), [27](#)).

Se reconocen alrededor de 907 especies de garrapatas, distribuidas en todo el mundo, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales ([28-30](#)); se agrupan junto con los ácaros en la subclase Acari. Las mismas poseen importancia médica y veterinaria debido al daño directo que causan cuando se alimentan y a la transmisión de microorganismos patógenos como protozoarios, bacterias, rickettsias y virus, además de la extracción de sangre al hospedador y la inoculación de sustancias tóxicas a sus hospederos ([26](#), [27](#), [30](#)).

El orden Ixodida, al que pertenecen las garrapatas, se divide en tres familias: la familia Ixodidae, con alrededor de 717 NCVE (Nombres Científicos Válidos de Especies) en el mundo, que se distingue por la presencia de placas o escudos de quitina, por lo cual se les conoce usualmente como garrapatas “duras o acorazadas”. Adicionalmente, por sus características morfológicas y/o biológicas los ixódidos se subdividen en garrapatas de rostro corto o largo y en garrapatas de uno, dos o tres hospederos ([31](#)).

Además, existe un dimorfismo sexual marcado (mayor tamaño de las hembras) y los orificios respiratorios (estígmato) se localizan posterior al cuarto par de patas. La familia Argasidae, cuenta con aproximadamente 189 NCVE en el mundo; se identifican por no poseer engrosamientos cuticulares, debido a esto se les denomina comúnmente como garrapatas “blandas o coriáceas”, las cuales además de encontrarse en mamíferos, también se encuentran parasitando aves; se caracterizan por un dimorfismo sexual poco marcado, por la localización de los estígmato entre la tercera y cuarta pata, las piezas bucales atrofiadas en

adultos y la ausencia de áreas porosas en las hembras. Por último, la familia Nuttalliellidae, la cual posee características intermedias entre las familias Argasidae e Ixodidae y está compuesta por una sola especie establecida en África (*Nuttalliella namaqua*, Bedford, 1931) ([26](#), [27](#), [30-32](#)).

Dentro de la familia Ixodidae, las garrapatas se clasifican de acuerdo a dos conceptos, uno morfológico y otro biológico. Así, el primer concepto corresponde a la longitud de los segmentos de los palpos que divide a las garrapatas en dos grupos: las garrapatas de rostro largo, en las cuales el segundo segmento es más largo que ancho, y las de rostro corto, en las cuales el segundo segmento es tan largo como ancho. En el segundo concepto, las garrapatas pertenecientes a esta familia se clasifican en tres tipos de acuerdo con el número de hospedadores que requieran para desarrollar su ciclo de vida como se señala a continuación ([32](#), [33](#)).

Las garrapatas de un solo hospedero: comprenden aquellas que pasan desde el estadio de larva a adulto sin cambiar de hospedero, abandonándolo solamente cuando están llenas de sangre y desprendiéndose de éste para ovipositar en el suelo; de los huevos ovipositados, eclosionan las larvas que experimentarán dos mudas sobre el animal parasitado. Ejemplo: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ([34](#), [35](#)).

Las garrapatas de dos hospederos cumplen sus fases de larva y ninfa en un solo hospedero y lo abandonan para mudar en el suelo, transformándose en adultas para buscar un segundo hospedador y completar su ciclo de vida. Ejemplo: *Rhipicephalus evertsi* ([31](#)).

Finalmente, las garrapatas de tres hospederos se caracterizan porque siendo larvas, parasitan a un hospedero, al que abandonan después de alimentarse de su sangre; se dejan caer al suelo, donde mudan a ninfas y suben a parasitar a un segundo hospedero, el cual es nuevamente abandonado y en el suelo se

transforman en adultos y vuelven a parasitar a un tercer hospedero. Ejemplo: *Amblyomma cajennense* (28, 31).

1.2.2. Distribución.

Las garrapatas se encuentran distribuidas en todo el mundo, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales. Evans (1975; 1978) y Liebisch (1984) suministran un resumen de los géneros y especies de garrapatas encontradas hasta esa fecha en Colombia, en Latinoamérica y en el mundo (Ver Tabla 3) (36-38).

Tabla 3. Número de especies de garrapatas encontradas en Colombia, en Latinoamérica y en el mundo.

Familia	Género	Colombia	América Latina	Mundial
Ixodidae	<i>Ixodes</i>	12	48	250
	<i>Amblyomma</i>	30	52	100
	<i>Dermacentor</i>	1	11	31
	*(<i>Anocentor</i>)	1	1	1
	<i>Haemaphysalis</i>	4	6	150
	<i>Rhipicephalus</i>	1	2	63
	** <i>Boophilus</i>	1	2	5
Argasidae	<i>Nothoaspis</i>	0	1	-
	<i>Argas</i>	4	7	50
	<i>Ornithodoros</i>	13	34	94
	<i>Otobius</i>	0 ++	2	2
	<i>Antricola</i>	1	4	4
TOTAL	11 (12)*	68 (9%)	170 (23%)	750 (100%)

* 12 Si se consideran *Dermacentor/Anocentor* géneros diferentes

**El género *Boophilus* ahora es subgénero del género *Rhipicephalus*

++ Rodríguez P. Julio Mario reportó por primera vez en Colombia la especie *Otobius megnini* (1984) (Comunicación personal)

Fuente: (31).

En Oceanía, Europa, norte de Asia y China, la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus* es la más importante, mientras que en América, Asia y África se

reportan *R. (B.) microplus*, *R. appendiculatus* y *Amblyomma hebraeum*. Es así que de las 81 especies reportadas en Estados Unidos, la más común en mamíferos pequeños corresponde a *Dermacentor variabilis* (39).

El género *Amblyomma* se encuentra ampliamente distribuido en Estados Unidos, México y Sudamérica (40), de otra parte, el género *Dermacentor* se encuentra en Canadá, Estados Unidos, México, Centro y Sur América y Oeste de la India y el género *Ixodes* se encuentra principalmente en Estados Unidos y Canadá, aunque también existen registros en Colombia (31; 40).

Los géneros *Rhipicephalus* y *Argas* se encuentran en todos los países tropicales del mundo y el género *Ornithodoros* se encuentra en California, Pacífico Mexicano, Kansas, Florida, Centro y Sur América, finalmente, el género *Otobius* se encuentra distribuido en América, India y África (41).

En Colombia, las primeras citas sobre garrapatas aparecen en descripciones de las colecciones entomológicas de Osorno Mesa (1939), donde se resumen las especies encontradas en su publicación “Las Garrapatas de la República de Colombia”; esta incluye una descripción de las especies identificadas, sus hospederos y lugares de ocurrencia, al igual que una clave para la identificación (42).

Recientemente, a partir del estudio de distribución de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* hecho por Cortés-Vecino *et al.* (2011) se publica un listado actualizado de los registros de esta especie en diversas regiones y altitudes de Colombia entre los años 1939 y 1999; y se registra, por primera vez para el país, la presencia de esta especie a una altitud superior a los 2.600 m.s.n.m. (43).

En Colombia existen 11 géneros (36, 37) considerando *Dermacentor* y *Anocentor* géneros diferentes y sosteniendo que en el sur de América se han observado los géneros *Aponomma* y *Hyalomma*. Aunque los estudios sobre la distribución de

garrapatas en Colombia son incompletos, al desconocerse el impacto de la mayoría de las especies existentes, se cuenta con una lista de aproximadamente 80 especies que afectan tanto animales domésticos como silvestres(44).

En Colombia se ha reportado la existencia de 50 especies correspondientes a 6 géneros de la familia Ixodidae. Estos datos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Géneros y número de especies de garrapatas reportadas en Colombia.

GÉNERO	NÚMERO DE ESPECIES
<i>Ixodes</i>	12
<i>Amblyomma</i>	30
<i>Haemaphysalis</i>	4
* <i>Dermacentor</i>	2
<i>Rhipicephalus</i>	1
** <i>Boophilus</i>	1
TOTAL	50

*Si se consideran *Dermacentor/Anocentor* géneros diferentes

**El género *Boophilus* actualmente es subgénero del género *Rhipicephalus*

Fuente: Adaptado de (31).

En Colombia aún muchas especies de garrapatas no han sido identificadas y la distribución de la gran mayoría es desconocida. Los proyectos de investigación que se deriven deben seguir una misma metodología para lograr la obtención precisa de un mapa sobre la identificación y distribución de especies de garrapatas tanto en animales domésticos como en silvestres (31).

1.2.3. Enfermedades Transmitidas por Garrapatas.

Las garrapatas son importantes vectores de agentes infecciosos patógenos para humanos y animales. Éstas, además de ser el primer grupo de artrópodos que fue reconocido como vector de enfermedades, hoy son el grupo que transmite mayor número de agentes infecciosos y desde la Salud Pública ocupan el

segundo puesto en el listado de vectores de mayor importancia, después de los mosquitos ([32](#), [45](#), [46](#)).

Entre los factores que contribuyen al importante papel vectorial que cumplen las garrapatas podemos listar: 1) períodos prolongados de alimentación hematófaga sobre el hospedero que aumentan la probabilidad de adquisición y transmisión de patógenos; 2) longevidad; 3) alto potencial reproductivo; 4) cuerpo esclerotizado que confiere protección a las condiciones medioambientales; 5) sustancias salivales, farmacológicamente activas, que facilitan el proceso de alimentación e inoculación de patógenos debido a que modulan la respuesta inmunológica de su hospedero; 6) varios episodios de alimentación durante el ciclo de vida, con la posibilidad, en algunos géneros, de utilizar varios hospederos para la alimentación y para completar el ciclo; 7) el ambiente en el intestino medio de las garrapatas es menos hostil que en insectos hematófagos, ya que éstas poseen proteasas intracelulares; en consecuencia, los patógenos ingeridos no están expuestos directamente a la acción proteolítica de estas enzimas; y 8) el mantenimiento de los microorganismos en la naturaleza a través de los fenómenos de transmisión transovárica, transestadial e intraestadial (31, 32).

Las formas de transmisión que usan las garrapatas para vehiculizar los diversos agentes patógenos pueden ser: las secreciones salivales (*Rickettsia rickettsii*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia ruminantium*), los fluidos coxales (*Borrelia* spp.-Fiebre Recurrente), regurgitación (*Borrelia* spp.-Enfermedad de Lyme), heces (*Coxiella* spp.-Fiebre Q) y la denominada vía activada por la saliva donde algunos de sus componentes pueden potenciar virus patógenos (Arbovirus asociados a garrapatas). Aunque pueden haber casos en que más de una de estas rutas puedan ser usadas en la transmisión de un patógeno, normalmente sólo una es relevante (y prevalente) desde el punto de vista epidemiológico ([32](#)).

La emergencia de muchas de las enfermedades transmitidas por garrapatas (y por otros vectores) se explica por diversos factores que favorecen el contacto entre los vectores infectados y los hospederos susceptibles. Entre estos se incluyen factores medioambientales (urbanización en zonas rurales, aumento de densidad de hospederos silvestres), climáticos, desastres naturales (terremotos, tsunamis), demográficos (aumento de población joven en economías emergentes y de población mayor en países desarrollados), comportamentales (migración poblacional y aumento de actividades recreativas en zonas rurales) y económicos (reducción de programas de vigilancia y control) ([46](#), [47](#)).

En las Tablas 5 y 6 se resumen algunas de las enfermedades transmitidas por garrapatas de mayor impacto en salud humana y animal, respectivamente.

1.3. Rickettsiosis Transmitidas por Garrapatas.

1.3.1. Interacción *Rickettsia*-Garrapata.

La relación entre las bacterias del género *Rickettsia* y los diversos artrópodos relacionados con éstas (garrapatas, piojos, pulgas, ácaros), comprende diferentes tipos de asociaciones biológicas relacionadas con la evolución de ambos organismos. Esta relación íntima se ha caracterizado por multiplicación eficiente, mantenimiento a largo plazo, transmisión transestadial y transovárica y amplia distribución ecológica y geográfica ([48](#)).

Telford y Parola (2005) postulan un paradigma general en la fase vectorial del ciclo de vida de las bacterias del género *Rickettsia*, que ha tenido implicaciones en el proceso evolutivo de este género bacteriano. En este paradigma se involucran diversos aspectos de la relación vector-patógeno. El primero, es el hallazgo común de bacterias similares a *Rickettsia* en múltiples artrópodos; el segundo, son las evidencias de una co-evolución de la bacteria con el artrópodo desde tiempos remotos y por último, la adecuada competencia y capacidad vectorial de diversos grupos de artrópodos para la transmisión de la bacteria a hospederos vertebrados ([49](#)).

La competencia vectorial es la susceptibilidad de una especie de artrópodo para infectarse con un patógeno y su habilidad para transmitir esta infección adquirida. La capacidad vectorial, por otro lado, es el análisis cuantitativo de las características ecológicas básicas del vector en relación con la transmisión del patógeno. Este concepto, desarrollado inicialmente para vectores de Malaria, permite entender cómo interactúan los componentes ecológicos involucrados en el ciclo de transmisión de diferentes enfermedades transmitidas por vectores (50).

Los elementos que contribuyen a una mejor competencia vectorial en la relación del artrópodo con *Rickettsia* son: requerimiento de una dosis mínima de la bacteria para iniciar la infección en el artrópodo; infección generalizada de la gran mayoría de tejidos del vector; el tropismo por tejidos de la glándula salival o intestino del vector como tejido reservorio para mantenimiento de la bacteria; el fenómeno de reactivación; las formas de inoculación por vía salival (salivaria) o por contaminación (estercoraria) y la capacidad de transmisión transovárica. De otro lado, el patógeno influencia la capacidad vectorial a través de los efectos en la eficacia biológica del vector y en la especificidad por el mismo (49).

Aunque normalmente la relación *Rickettsia*-artrópodo es de tipo simbiótico (comensal), en algunos casos su efecto puede ser parasitario o patógeno, a través de la alteración de la reproducción, la manipulación de los procesos celulares e incluso generando efectos letales en el hospedero invertebrado (48).

Tabla 5. Principales enfermedades transmitidas por garrapatas en humanos.

Enfermedad ^a	Agente Etiológico	Vector(es) (Incriminados-Potenciales)	Distribución
Anaplasmosis Granulocítica Humana	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Haemaphysalis concinna</i> , <i>H. punctata</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i>	Europa, Norteamérica
Babesiosis	<i>Babesia divergens</i> , <i>B. microti</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Europa, Norteamérica
Ehrlichiosis Humana	<i>Ehrlichia chaffeensis</i> , <i>E. ewingii</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	Norteamérica
Encefalitis de Powasan	<i>Flavivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Ixodes cookie</i> , <i>I. scapularis</i>	Asia, Norteamérica
Encefalitis transmitida por garrapatas (TBE)	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>Haemaphysalis concinna</i> , <i>H. punctata</i>	Asia, Europa
Encefalomielitis Ovina (Louping III)	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa (occidental)
Enfermedad de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Asia, Europa, Norteamérica
Enfermedad Forestal de Kyasanur	<i>Flavivirus</i>	<i>Haemaphysalis. spinigera</i> , <i>H. turturis</i>	Asia (India)
Fiebre de Garrapatas del Colorado	<i>Coltivirus</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Norteamérica (occidental)
Fiebre Hemorrágica de Omsk	<i>Flavivirus</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Asia
Fiebre Hemorrágica del Crimean-Congo	<i>Nairovirus</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i> , <i>H. anatolicum</i> , <i>H. marginatum</i> , <i>H. truncatum</i> , <i>Rhipicephalus bursa</i>	África, Asia, Europa
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Múltiples especies de diferentes géneros	África, Asia, Australia, Europa, Norteamérica
Fiebre Recurrente asociada a garrapatas	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Ornithodoros</i> spp.	África, Asia, Europa, América
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Múltiples especies de diferentes géneros	Asia, Europa, Norteamérica

a. No se incluyen enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia* (ver tablas 2 y 7)

Fuente: (32, 45, 51, 52).

Tabla 6. Principales enfermedades transmitidas por garrapatas en animales.

Enfermedad ^a	Agente Etiológico	Vector(es) (Incriminados-Potenciales)	Hospederos	Distribución
Aegyptianellosis	<i>Aegyptianella pullorum</i>	<i>Argas</i> spp.	Aves	África, Europa
Anaplasmosis	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>D. occidentalis</i> , <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>R. sanguineus</i>	Rumiantes	Mundial
Anaplasmosis Granulocítica	<i>Anaplasma phagocytophila</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Caninos, Equinos	Europa, Norteamérica
Babesiosis	<i>Babesia</i> spp.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>R. (B.) annulatus</i> , <i>R. sanguineus</i>	Rumiantes, Equinos	Mundial
Corazón de Agua o Cowdriosis Bovina	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> , <i>A. hebraeum</i>	Rumiantes	África, Antillas
Cytauxzoonosis Felina	<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Dermacentor variabilis</i>	Felinos	Norteamérica
Ehrlichiosis Canina	<i>Ehrlichia canis</i> , <i>E. ewingii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Amblyomma americanum</i>	Caninos	Mundial
Encefalomielitis Ovina (Louping III)	<i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Ovinos	Europa
Enfermedad de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>	Varios animales domésticos	Asia, Europa, Norteamérica

a. No se incluyen enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia* (ver tablas 2 y 7)

Fuente: (32, 45, 52, 53).

Tabla 6. Continuación.

Enfermedad ^a	Agente Etiológico	Vector(es) (Incriminados-Potenciales)	Hospederos	Distribución
Enfermedad Ovina de Nairobi	Virus Bunyamwera	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>R. pulchellus</i>	Ovinos, Caprinos	África
Espiroquetosis Aviar	<i>Borrelia anserina</i>	<i>Argas persicus</i>	Aves	Asia, Norteamérica
Fiebre de la Costa del Este	<i>Theileria parva</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i> / <i>R. zambiensis</i> , <i>R. duttoni</i>	Bovinos, Bufalinos	África
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Múltiples especies de diferentes géneros	Varios animales domésticos	África, Asia, Australia, Europa, Norteamérica
Hepatozoonosis Canina	<i>Hepatozoon canis</i> , <i>H. americanum</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Amblyomma maculatum</i>	Caninos	América
Peste Porcina Africana	<i>Iridovirus</i>	<i>Ornithodoros moubata</i> , <i>O. erraticus</i>	Porcinos	África, Asia
Theileriosis Tropical	<i>Theileria annulata</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Bovinos, Equinos	África, Asia, Europa
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Múltiples especies de diferentes géneros	Ovinos, Equinos, Conejos	Asia, Europa, Norteamérica

a. No se incluyen enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia* (ver tablas 2 y 7)

Fuente: (32, 45, 52, 53).

Las garrapatas, principalmente de la familia Ixodidae (“garrapatas duras”) pueden actuar como vectores, reservorios y amplificadores de bacterias del género *Rickettsia* del grupo SFG (54). Dentro de éste grupo hay dos excepciones que son *R. felis* y *R. akari* las cuales son transmitidas por pulgas y ácaros, respectivamente (49). La acción vectorial se relaciona con la capacidad de infección y vehiculización del patógeno al hospedero susceptible (capacidad vectorial) y la capacidad de las garrapatas para ser reservorios y amplificadores está determinada por los fenómenos biológicos de transmisión transestadial y transovárica.

Las garrapatas pueden adquirir las bacterias del género *Rickettsia* por diversas vías. La primera es durante el proceso de alimentación hematófaga en un hospedero vertebrado rickettsémico (con presencia de la bacteria en el torrente circulatorio) en cualquiera de los tres estadios parasíticos (larva, ninfa o adulto); la segunda es a través de la transmisión vertical (transovárica); la tercera es a través de la co-alimentación entre diferentes garrapatas y la última es la vía sexual, donde un macho infectado puede transmitir la bacteria a garrapatas hembra no infectadas. Esta última, sin embargo, parece ser una vía poco eficiente debido a que las hembras infectadas de forma venérea no transmiten el patógeno a su progenie (55).

La adquisición a través de la alimentación hematófaga se da de forma eficiente solo en algunos hospederos vertebrados que logran mantener esta rickettsemia durante el tiempo necesario para la infección de nuevas poblaciones de garrapatas no infectadas (49). Para el caso de *R. rickettsii*, por ejemplo, se puede mantener la infección en garrapatas criadas en laboratorio debido a la rickettsemia, de adecuada duración y magnitud, evidenciada en hospederos como *Microtus pennsylvanicus* (Rodentia:Cricetidae), *Callospermophilus lateralis* (Rodentia:Sciuridae) (o

“Ardilla de Manto Dorado”) y otras ardillas de la familia Sciuridae; mientras que en otros mamíferos domésticos o silvestres (perro, ratas algodóneras o ratas de la madera), susceptibles a la infección por esta bacteria, esta rickettsemia es transitoria y por ende no es adecuada para infectar el artrópodo (54).

La vía de transmisión transovárica permite mantener y amplificar la infección por *Rickettsia* en las poblaciones de garrapatas. Esta vía ha sido demostrada en varias especies del grupo SFG como *R. africae* (56), *R. bellii* (57), *R. helvetica* (58), *R. massiliae* (59), *R. parkeri* (60), *R. rickettsii* (61, 62) y *R. slovaca* (63). Sin embargo, debe resaltarse, que este fenómeno biológico puede variar entre las diferentes especies de la bacteria y del artrópodo (y aún entre sujetos de la misma especie) en variables como la proporción de huevos infectados (tasa de infección filial) o el número de generaciones en la cual se puede mantener el microorganismo(49).

El proceso de co-alimentación o también denominado transmisión no-sistémica, es el mecanismo de intercambio de un patógeno entre artrópodos infectados y no infectados que se alimentan de un hospedero sin manifestaciones de infección sistémica. Esta vía, aunque ha sido demostrada en especies como *R. massiliae* (64) y *R. conorii israelensis* (65) aún debe ser estudiada en otras especies de la bacteria y el artrópodo y establecer su importancia en los ciclos naturales de la enfermedad.

La especificidad de las asociaciones *Rickettsia*-garrapata es variable, ya que mientras en algunas especies, como es el caso de *R. rickettsii*, pueden existir asociaciones con múltiples especies e incluso géneros de garrapatas, para otras la asociación es altamente específica, involucrando únicamente una especie del vector (*R. conorii* y *Rhipicephalus sanguineus*)

o en otros casos, varias especies de un único género (*R. africae* y *Amblyomma* spp.) (54).

Otro aspecto que es de interés en esta relación es el concepto de refractariedad en situaciones de co-infección. Varios estudios han demostrado que garrapatas infectadas con una especie determinada del género *Rickettsia* pueden inhibir una nueva infección y mantenimiento de otra especie (66, 67). Estudios hechos, en condiciones de laboratorio, con las especies *R. montana* y *R. rhipicephali* en *Dermacentor variabilis*, evidenciaron la inhibición recíproca de la infección y mantenimiento a través de la transmisión transovárica hasta por dos generaciones, sugiriendo una posible alteración de la expresión molecular de los oocitos que pudiese impedir la infección por la segunda especie (67).

En la asociación biológica *Rickettsia*-garrapata se ha demostrado un fenómeno de “reactivación” de la bacteria asociada a condiciones específicas del artrópodo y su ambiente (68). Bajo condiciones de estrés fisiológico de la garrapata como bajas temperaturas ambientales o ayuno, la bacteria entra en una fase latente. Una vez la garrapata inicia el consumo de sangre en un hospedero susceptible y la temperatura interna se incrementa después de un tiempo definido (24-48 horas), la bacteria se activa nuevamente. Esto se ha demostrado en laboratorio por las diferentes tasas de mortalidad en biomodelos animales expuestos a garrapatas infectadas, mantenidas a bajas (4°C) y a altas temperaturas (21°C) (69). Los mecanismos moleculares asociados a la adaptación de *Rickettsia* a diferentes condiciones del artrópodo y a sus cambios en la actividad aún son desconocidos. No obstante, existen algunas hipótesis moleculares relacionadas con grupos de genes bacterianos (*spoT*) de adaptación a condiciones de estrés, cambios en proteínas de superficie

externa en infecciones alternantes entre el mamífero y el artrópodo (70) o cambios ultraestructurales en la membrana externa bacteriana (71).

A continuación, se revisarán algunos aspectos de las principales especies del género *Rickettsia*, asociadas a garrapatas, identificadas en Suramérica como agentes causales de enfermedad.

1.3.2. *Rickettsia rickettsii* (Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas-RMSF).

1.3.2.1. Etiología.

El agente causal de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas es *Rickettsia rickettsii*, bacteria altamente patógena del grupo SFG que presenta varias de las características bacteriológicas ya descritas para el género y el grupo. La enfermedad, también conocida como “Fiebre Maculosa Brasileira” (Brasil) o “Fiebre de Tobia” (Colombia) produce cuadros clínicos que pueden llegar a ser fatales en humanos y animales.

Esta alfaproteobacteria tiene la capacidad de infectar y hacer procesos de replicación al interior del citosol y en algunos casos del núcleo, en células de sus hospederos vertebrados (endotelio, músculo liso vascular y macrófagos) o invertebrados (hemocitos, epitelio de glándula salival). Aunque no tiñe adecuadamente con Wright, coloraciones como Giemsa, Giménez, Machiavello y Castañeda permiten visualizarla (72).

La información genómica de este y otros géneros puede contribuir al entendimiento de la patogénesis y al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y vacunas (73). El genoma completo de la cepa ‘Sheila Smith’ (University of Iowa, Iowa City, EE.UU.), con un tamaño total de

1'257.710 bp (=1,25 Mb) y 822 genes, puede encontrarse en el GenBank® con el número de acceso CP000848.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000848>).

1.3.2.2. Distribución.

La distribución de *Rickettsia rickettsii* está restringida a América y a la fecha ha sido reportada en países como Argentina, Brasil, Canadá, Colombia, Costa Rica, Estados Unidos, México y Panamá (61, 74). En muchos de estos, su detección fue realizada durante la primera mitad del siglo XX y después de un largo período de “ausencia” o reducción de casos clínicos, re-emerge como un problema de Salud Pública hacia las últimas décadas del S. XX y comienzos del S. XXI (61).

La distribución de casos de la enfermedad está asociada a la distribución de los vectores asociados. En Estados Unidos, por ejemplo, la distribución de casos se relaciona con la del vector primario, *Dermacentor variabilis*, en los estados centrales, orientales y costa pacífica del país, y con la de *D. andersoni* en la región occidental (75). En Brasil, por otra parte, su distribución se relaciona con la de *Amblyomma cajennense* en diversas regiones del país y con *A. aureolatum* en el Área Metropolitana del Estado de São Paulo (76).

1.3.2.3. Transmisión.

La vía primaria de transmisión de *Rickettsia rickettsii* a hospederos vertebrados susceptibles es a través de la saliva de garrapatas de la familia Ixodidae durante el proceso de alimentación (73). Una vez la garrapata asciende al hospedero e inicia el proceso de alimentación requiere un período mínimo de 4 a 6 horas para iniciar la transmisión efectiva de la bacteria, aunque para que sea realmente eficaz, deberá prolongarse por 22 a 24 horas (77, 78). Otras formas de transmisión,

menos comunes, son las transfusiones sanguíneas (79), por el contacto con material biológico proveniente de tejidos o fluidos de garrapatas infectadas o con aerosoles contaminados (principalmente en condiciones de laboratorio) (80, 81).

Las garrapatas pueden actuar como vectores o reservorios de esta especie, debido a la capacidad para mantenerla a través de diversos estadios (transmisión transtadial) y generaciones (transmisión transovárica). *D. variabilis*, es el vector primario en gran parte de los Estados Unidos, parte de Canadá (provincia de Saskatchewan) y norte de México. Las ninfas y adultos de esta especie inician actividad durante marzo y abril y se extienden hasta los meses de agosto o septiembre. De otra parte, *D. andersoni* ha sido incriminada como vector en la región de las Montañas Rocosas en los Estados Unidos y es el principal vector en Canadá (54) y *Amblyomma americanum* fue incriminado recientemente en un caso de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en Carolina del Norte (82). Otras especies como *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes dentatus*, *Dermacentor occidentalis*, *D. parumapertus*, y *Ornithodoros parkeri* (Argasidae) se consideran vectores potenciales en esta región, por la infección en condiciones naturales o la capacidad de transmisión en condiciones de laboratorio (83-85).

La especie *Rhipicephalus sanguineus*, denominada “Garrapata Marrón o Común del Perro” ha sido incriminada como vector de *R. rickettsii* en México (86, 87) y en el Estado de Arizona (EE.UU.) (88). En el sudeste brasileño, se considera un vector potencial después de recientes estudios experimentales y de detección de infección natural (10, 89, 90). Esta garrapata, de hábitos intradomiciliarios, que parasita principalmente perros domésticos (91) y que puede parasitar humanos

(92), podría tener un papel relevante como vector en algunas zonas endémicas con características ecológicas específicas.

Amblyomma cajennense (conocidas como “Tostonas”, “Cuitivas”, “Veraneras” o “Venaderas” en Colombia) es el principal vector de *R. rickettsii* en Centro y Suramérica; su amplia distribución en el Continente Americano (93) y sus hábitos antropofílicos (94) la llevan a ser la especie con mayor potencial vectorial en toda la región. Aunque todos los estadios de esta especie pueden parasitar humanos, normalmente, los porcentajes de infección son muy bajos en condiciones naturales y alcanzan niveles tan bajos como el 1% en zonas endémicas para la enfermedad (95). Infecciones naturales de esta garrapata con *R. rickettsii* han sido confirmadas en Argentina (96), Brasil (95, 97), México (98) y Panamá (99).

Amblyomma aureolatum, denominada en portugués “Carrapato Amarelo do Cão” (“Garrapata Amarilla del Perro”) ha sido incriminada como vector en el Área Metropolitana de São Paulo (Brasil) desde principios del Siglo XX (76). Los adultos de esta especie parasitan perros domésticos (100) en áreas rurales cercanas a reductos de bosque húmedo tropical, lo que favorece el traspaso accidental a seres humanos en las viviendas y la consecuente transmisión del microorganismo (10). Esta garrapata, altamente susceptible a la infección por *R. rickettsii* y muy eficiente en la transmisión transovárica y transestadial, puede presentar porcentajes de infección en la naturaleza menores al 1% debido, tal vez, al bajo desempeño reproductivo y a la alta mortalidad en hembras ingurgitadas (101).

Los reportes de infección natural de garrapatas por bacterias del género *Rickettsia* se ha realizado en gran parte a través del test de

hemolinfa. En esta técnica hay una identificación de la bacteria a través de la coloración de Giménez en muestras de hemolinfa tomadas de uno de los apéndices de la garrapata (102). Ésta técnica, aunque no permite diferenciar entre especies, aún es usada en algunos trabajos debido a su bajo costo y facilidad de ejecución. Otra alternativa, ampliamente aceptada o utilizada, ha sido el uso de PCR y secuenciación como métodos de identificación molecular de especies en muestras de DNA extraído de tejidos de la garrapata (73).

En condiciones naturales, las garrapatas tienen bajas tasas de infección por *R. rickettsii*. Una de las principales causas de este fenómeno es el efecto patógeno que ejerce *Rickettsia* en algunas especies de garrapatas, lo cual ha sido demostrado en especies como *D. andersoni* y *D. variabilis* (69, 103). Aunque las garrapatas sean los principales reservorios en condiciones naturales (104), el efecto patógeno puede afectar el mantenimiento de la bacteria; es por esto que en el ciclo biológico es esencial el papel de algunos hospederos vertebrados (hospederos de amplificación) en la infección de nuevas poblaciones de garrapatas.

Labruna (2009) (76) postula cinco características esenciales que debe tener un hospedero vertebrado para poder actuar como un eficiente hospedero de amplificación para *R. rickettsii* en un área endémica: 1) El hospedero debe ser abundante en el área endémica para *R. rickettsii*; 2) Debe ser un hospedero esencial para la especie de garrapata que actúe como vector; 3) Debe ser susceptible a la infección por *R. rickettsii*; 4) Una vez infectado por la bacteria, el hospedero debe desarrollar una rickettsemia de suficiente duración y magnitud para que la infección de las garrapatas que se alimenten en

éste y 5) Debe ser una especie prolífica, que permita la introducción de nuevos individuos susceptibles a la infección por la bacteria.

En Estados Unidos, diversas especies de pequeños mamíferos, principalmente roedores, han sido identificadas como hospederos de amplificación para *R. rickettsii*; un ejemplo de éstos es *Microtus pennsylvanicus* (Rodentia: Cricetidae), roedor que actúa como hospedero de *D. variabilis* (105). En Brasil, por otro lado, se han caracterizado hasta el momento dos especies como hospederos amplificadores de *A. cajennense*, una es la zarigüeya (“chucha” o “fara” en Colombia) (*Didelphis* spp.) y el otro es el capibara (“chigüiro” en Colombia) (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Otros hospederos amplificadores potenciales en este país son el conejo silvestre (*Sylvilagus brasiliensis*) y el perro doméstico, aunque su papel epidemiológico aún requiere mayor estudio (76).

1.3.2.4. Impacto en Salud Pública.

La incidencia de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas ha variado ampliamente a través de su historia. En Estados Unidos, por ejemplo, el Sistema Nacional de Vigilancia para esta enfermedad, que inició actividades desde el año 1920, sólo empieza a recolectar datos epidemiológicos detallados a partir de 1970, año en el que se recibieron los primeros reportes de casos clínicos (106). Es así como en el período comprendido entre el año 1920 y 1949 la incidencia se incrementó hasta 2,5 casos por millón de habitantes pero, después de la muerte del Director del Laboratorio de las Montañas Rocosas, el Dr. Ralph Parker, quién durante casi 30 años trabajó incansablemente en las actividades de vigilancia de esta enfermedad, cayó la incidencia hasta sus niveles más bajos (1 caso/millón de hab.) en el año de 1950 y se mantuvo así hasta mediados de la década del 70. A partir de allí la

incidencia ha variado entre 1,5 y 5,0 casos/millón de habitantes (72), aunque, en el periodo comprendido entre los años 2002 y 2007 ésta alcanzó niveles históricos de hasta 7 casos/millón de hab., aparentemente por una mayor disponibilidad de los estuches diagnósticos de ELISA (107).

Los países que más reportan la enfermedad en el Continente Americano son Estados Unidos y Brasil. En ambos existe un sistema de reporte obligatorio de casos y fuertes sistemas nacionales de vigilancia epidemiológica. En los Estados Unidos, como ejemplo, 11.531 casos fueron reportados entre el año 2000 y 2007 de los cuales fueron confirmados 2.258, con un rango que osciló entre 490 y 2.133 casos anuales (107). En Brasil, solo en el Estado de São Paulo fueron confirmados 440 casos entre los años 1985 y 2011 y en el periodo 1997-2010, 868 casos fueron confirmados en 9 estados del país (108).

El número de muertes causadas por la enfermedad es un indicador de alto impacto en Salud Pública. Sólo entre 1983 y 1998, 612 muertes fueron reportadas en los Estados Unidos y se estima que 400 adicionales no fueron reportadas en el mismo período (109). En Brasil, entre 1997 y 2010 se reportaron un total de 227 muertes en los 9 estados con vigilancia epidemiológica activa (108). Las tasas de caso-fatalidad oscilan entre 10 y 25% en pacientes no tratados a tiempo (54) y las tasas de mortalidad pueden ser de 20% en casos no tratados y de 5% en los tratados (73). Los factores asociados con alta mortalidad son edad del paciente (>60 años); intervalo de tratamiento mayor a 5 días desde el inicio de manifestaciones clínicas; falta de tratamiento con tetraciclinas o únicamente con cloranfenicol (106).

Cabe resaltar que estos y otros indicadores epidemiológicos pueden estar subvalorados debido al sub-registro de la enfermedad en estos y en otros países endémicos. Las causas de este sub-registro pueden ser las fallas en los procesos formativos de médicos y personal de la salud asociado; la presentación inespecífica de la enfermedad que dificulta su diagnóstico clínico; las fallas en el registro de picaduras y exposición a garrapatas, que ayudaría a iniciar terapias empíricas con doxiciclina; la falta de infraestructura y acceso en el diagnóstico por laboratorio y la baja sensibilidad de algunas técnicas diagnósticas durante la fase aguda; y la falta de investigadores y personal que trabaje en aspectos básicos y aplicados de la Rickettsiología ([61](#), [110](#)).

1.3.2.5. Presentación Clínica en Humanos.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos son inespecíficas y los cuadros pueden tener manifestaciones sistémicas, cutáneas, cardíacas, pulmonares, gastrointestinales, renales, neurológicas, oculares y musculoesqueléticas ([111](#)). El período de incubación promedio es de 7 días (2-14 días) después de la picadura inicial de la garrapata y los signos clínicos iniciales son similares a los de otras enfermedades asociadas a garrapatas e incluso a otras entidades virales y bacterianas como Dengue, Hantaviriosis y Leptospirosis, entre otras ([54](#), [73](#)).

A diferencia de otras Fiebres Manchadas causadas por rickettsias del grupo SFG, es infrecuente la formación de escara en el sitio de unión de la garrapata, lo que dificulta aún más el diagnóstico clínico inicial. Al inicio de la fase clínica, el paciente puede manifestar fiebre y cefalalgia que pueden estar acompañadas de malestar general, mialgia, náuseas, vómito, anorexia, dolor abdominal focal o generalizado y diarrea. Durante los primeros 3 días de la enfermedad, la clásica triada

de fiebre, cefalalgia y erupción maculopapular se observa únicamente en un 3% de los pacientes y después de dos semanas de la picadura inicial esta proporción aumenta a 60 ó 70% ([54](#), [78](#), [112](#)).

La erupción maculopapular (denominado en inglés “rash”) es una de las manifestaciones clínicas más importantes. Esta erupción aparece después del tercer día de manifestación febril e inicia con máculas pequeñas, irregulares y rosadas que se localizan típicamente en muñecas, tobillos y antebrazos. Posteriormente, la erupción puede evolucionar a pápulas o petequias y en casos severos, el daño tisular continuo, puede producir necrosis en piel y gangrena. La erupción normalmente se observa en pacientes al quinto día de inicio de la enfermedad, aunque en aproximadamente un 10% de los pacientes ésta puede estar ausente, dificultando aún más el diagnóstico y tratamiento oportunos ([54](#), [113](#)).

Otras manifestaciones clínicas son miocarditis, de presentación poco común; hepatomegalia; manifestaciones respiratorias como tos y neumonía; falla renal aguda (común en casos severos); signos musculoesqueléticos; algunas manifestaciones neurológicas como letargia, fotofobia, amnesia, cambios comportamentales, sordera transitoria; y signos oculares como conjuntivitis, oclusión arterial, engrosamiento de la vena retiniana y hemorragia en retina ([73](#), [112](#)).

1.3.2.6. Presentación Clínica en Animales.

Existen pocos reportes de manifestación natural de la enfermedad en animales domésticos. Hasta el momento solo se ha descrito la enfermedad clínica en perros domésticos donde se conoce también como Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. Su distribución también está restringida a América y los vectores incriminados en

casos humanos serían los mismos asociados a la transmisión en caninos([114](#)).

En su mayoría, las infecciones en perros son subclínicas y en muchas ocasiones hay altas tasas de seropositividad de animales sanos en zonas endémicas, lo cual favorece su uso como centinelas en programas de vigilancia epidemiológica ([115](#)).

Los caninos con la entidad clínica presentan fiebre, letargia, vómito y anorexia y a medida que la enfermedad progresa, otros signos como lesiones oculares, alteraciones en la coagulación (trombocitopenia), artralgias, orquitis y signos neurológicos pueden ser observados ([52](#), [116](#), [117](#)). Algunos casos clínicos en zonas endémicas para la enfermedad o asociados a enfermedad en humanos (propietarios) han sido documentados en Brasil ([118](#)) y los Estados Unidos ([119](#)).

1.3.3. *Rickettsia parkeri*.

Esta especie, aunque fue aislada por primera vez por R. R. Parker de garrapatas *Amblyomma maculatum* colectadas de bovinos del Estado de Texas en el año de 1939, solo fue incriminada como agente causal de enfermedad en humanos hasta el año 2004 ([120](#)). Su distribución, al igual que *Rickettsia rickettsii* está circunscrita a América donde se han emitido reportes de enfermedad en países como Argentina ([121](#)), Estados Unidos ([120](#)) y Uruguay ([122](#)).

En su transmisión a hospederos vertebrados están involucradas principalmente garrapatas del género *Amblyomma*. En Estados Unidos se han incriminado las especies *A. maculatum* y *A. americanum* ([123](#), [124](#)), mientras que en países de Suramérica como Uruguay y Brasil se ha relacionado con *A. triste* ([125](#)). La amplia distribución de *A. maculatum* y *A.*

triste en la mayoría de países de América, podría indicarnos que *R. parkeri* sigue este patrón de distribución (76). Otras especies donde ha sido identificada esta bacteria o genotipos filogenéticamente cercanos a ésta son *A. tigrinum* en Bolivia (126) y *A. calcaratum*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *A. longirostre* y *A. parkeri* en Brasil (127-130).

Diversos animales domésticos y silvestres podrían estar involucrados en los ciclos naturales de *R. parkeri*, aunque su rol específico como reservorios o amplificadores aún se desconoce. En los Estados Unidos, el ganado bovino, principal hospedero de *A. maculatum*, podría ser importante en el mantenimiento de un gran número de garrapatas infectadas por *R. parkeri* y de su transporte a otras zonas (131). Por otro lado, el perro doméstico, que presenta rickettsemias en infecciones por esta especie (132), al igual que algunos roedores y aves silvestres con reacciones seropositivas (128, 133, 134) podrían cumplir un papel epidemiológico en algunas zonas geográficas.

La enfermedad producida por *R. parkeri* en pacientes humanos presenta manifestaciones similares a las de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. En ambas se observan signos clínicos como fiebre, mialgia, malestar general, cefalalgia y erupciones maculopapulares que pueden involucrar las palmas de las manos o las plantas de los pies, en un curso de duración cercano a una semana después de la picadura de la garrapata. No obstante, la severidad de la enfermedad por *R. parkeri* es indudablemente menor, con una baja proporción de pacientes hospitalizados y sin la presentación de cuadros neurológicos severos, con fallas orgánicas o fatales (135).

Esta similitud clínica puede explicar el diagnóstico errado o sub-diagnóstico en muchos casos de infección por *R. parkeri* (76). Aún más, debido a que

en el diagnóstico serológico de Rickettsias del grupo SFG se presentan reacciones cruzadas entre los antígenos de múltiples especies, se ha corroborado que algunas infecciones por *R. parkeri* en Estados Unidos y Uruguay previamente habían sido diagnosticadas como Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas o Fiebre Manchada del Mediterráneo ([125](#), [136](#)).

Un signo característico de la enfermedad por *R. parkeri* es la presentación de múltiples “Escaras de Inoculación”. Esta manifestación aunque es inusual en la mayoría de especies del grupo SFG, también ha sido descrita en otras especies como *R. africae* y *R. sibirica mongolotimonae* ([54](#)) y puede ser evidente hasta en un 90% de los pacientes que sufren la enfermedad ([135](#)).

1.3.4. Otras Especies de *Rickettsia* Transmitidas por Garrapatas.

Múltiples especies de *Rickettsia* asociadas a garrapatas, cuyo papel patógeno aún no es claro, han sido identificadas en América desde inicios de este siglo. Las especies *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. monteiroi*, *R. rhipicephali*, *R. massiliae* y Candidatus ‘*R. andeanae*’, son algunos ejemplos ([74](#)).

Aunque *R. amblyommii* no ha sido identificada como agente patógeno en humanos, recientemente fue implicada como posible causa de casos de Rickettsiosis previamente diagnosticados como Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en el Estado de Carolina del Norte (Estados Unidos). En este estudio, los sueros de pacientes sospechosos a RMSF tuvieron títulos de anticuerpos (IgG) que aumentaron hasta cuatro veces entre los sueros pareados (agudo y convaleciente) para el antígeno de *R. amblyommii* pero no para *R. rickettsii*. Por otro lado, se colectaron pocos especímenes de *D. variabilis* contrastando con un alto número de

garrapatas de la especie *A. americanum* positivas a DNA de *R. amblyommii* ([137](#)).

Esta especie ha sido detectada en diversas especies de garrapatas en América. Entre estas cabe mencionar *Amblyomma neumanni* en Argentina ([138](#)); *A. ovale* en Panamá ([139](#)); *A. cajennense* en Costa Rica ([140](#)), Brasil ([141](#)) y Panamá ([142](#)); *A. americanum* en Estados Unidos ([143](#), [144](#)); *A. coelebs* en Brasil ([141](#)) y Guyana Francesa ([145](#)); *A. longirostre* en Brasil ([130](#), [146](#)); *A. geayi* en Brasil ([147](#)) y *Rhipicephalus sanguineus* y *Dermacentor nitens* en Panamá ([139](#), [142](#)).

R. massiliae, una especie de la cual solo habían registros en el viejo mundo, fue detectada recientemente en una paciente proveniente de Argentina. La mujer afectada manifestó fiebre (40°C); una erupción purpúrica en el tronco, extremidades superiores e inferiores, que involucraba región palmar y plantar; una escara en el sitio de picadura e historia de posible exposición a garrapatas de su perro ([148](#)). Aunque estudios previos en el Estado de Arizona (EE.UU.) ya habían detectado y aislado esta especie en garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* ([149](#)) y recientemente se haya corroborado este hallazgo en la costa este de Estados Unidos ([150](#)) y en el Estado de California ([151](#)), aún se desconoce si esta u otras especies del género podrían estar involucradas en la transmisión en América.

R. rhipicephali ha sido detectada en garrapatas de la especie *Haemaphysalis juxtakochi* en los estados de São Paulo y Rondônia en Brasil ([152](#), [153](#)). Por su parte, la especie Candidatus '*R. andeanae*' ha sido detectada en *Amblyomma parvum* y *A. pseudoconcolor* en Argentina ([154](#), [155](#)); *A. triste* en Chile ([156](#)); *A. maculatum* en Estados Unidos ([157](#)) y Perú e *Ixodes boliviensis* en este último país ([158](#)).

En el Estado de São Paulo (Brasil) fue detectada recientemente una especie a la que se le ha asignado el nombre de *R. monteiroi* en honor al importante investigador de la rickettsiología brasilera, José Leimos Monteiro. Esta especie fue aislada de la garrapata *Amblyomma incisum* y los análisis de sus secuencias arrojan altos porcentajes de homología con otras especies como *R. bellii* y *R. canadensis* y su ubicación filogenética se asocia al clado de esta última ([159](#)).

R. bellii, la cual es una especie no perteneciente al grupo SFG, se ha detectado molecularmente en múltiples especies de garrapatas en América. En la mayoría de los reportes su detección ha sido en especies del género *Amblyomma* como *A. neumanni* y *A. tigrinum* en Argentina ([138](#), [160](#)); *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. scalpturatum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. incisum* y *A. nodosum* en Brasil ([141](#), [161-163](#)); *A. sabanarae* en El Salvador ([164](#)); *A. varium* en el Perú ([165](#)) y en otros géneros como *Ixodes ricinus* y *Haemaphysalis juxtakochi* en Brasil ([153](#)) y *Dermacentor variabilis* en Estados Unidos ([166](#)).

En la Tabla 7 se resumen las especies de *Rickettsia*, patógenas y no patógenas, asociadas a garrapatas, identificadas en el Continente Americano. En la Figura 8 se ilustra su localización geográfica.

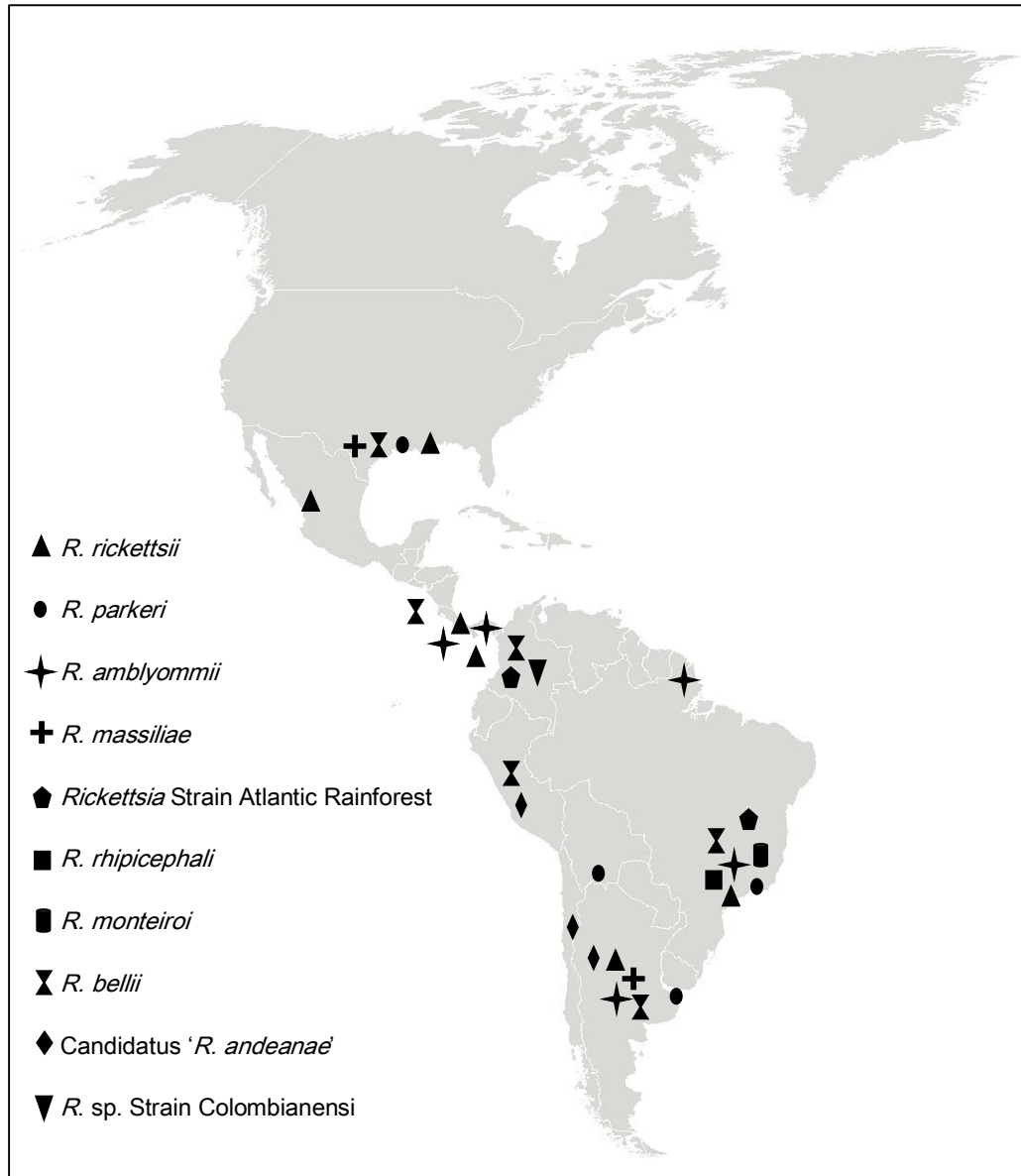


Figura 8. Especies de *Rickettsia* detectadas en garrapatas en América.
Fuente: adaptado de (74, 76, 167-169, 188).

Tabla 7. Especies de *Rickettsia* asociadas a garrapatas identificadas en América.

Especie de <i>Rickettsia</i>	Especie de Garrapata	País(es)
<i>R. amblyommi</i> ^a	<i>Amblyomma neumanni</i>	Argentina
	<i>A. cajennense</i>	Brasil, Costa Rica, Panamá
	<i>A. coelebs</i>	Brasil, Guyana Francesa
	<i>A. longirostre</i>	Brasil
	<i>A. geayi</i>	
	<i>A. ovale</i>	Panamá
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	
	<i>Dermacentor nitens</i>	
<i>R. africae</i>	<i>A. variegatum</i>	Islas del Caribe (Islas Vírgenes, Dominica, Montserrat, Nevis, St. Kitts y St. Lucia)
<i>R. bellii</i>	<i>A. neumanni</i>	Argentina
	<i>A. tigrinum</i>	
	<i>A. ovale</i>	Brasil
	<i>A. oblongoguttatum</i>	
	<i>A. sculpturatum</i>	
	<i>A. humerale</i>	
	<i>A. rotundatum</i>	
	<i>A. aureolatum</i>	
	<i>A. dubitatum</i> ^b	
	<i>A. incisum</i>	
	<i>A. nodosum</i>	
	<i>Amblyomma</i> sp.	Colombia
	<i>A. sabanarae</i>	El Salvador
	<i>A. varium</i>	Perú
	<i>D. variabilis</i>	Estados Unidos
	<i>Ixodes loricatus</i>	Brasil
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Argentina, Estados Unidos
<i>R. monteiroi</i>	<i>A. incisum</i>	Brasil
<i>R. parkeri</i> ^c	<i>A. maculatum</i>	Estados Unidos
	<i>A. americanum</i>	
	<i>A. tigrinum</i>	Bolivia
	<i>A. triste</i>	Uruguay
	<i>A. calcaratum</i>	Brasil
	<i>A. nodosum</i>	
	<i>A. ovale</i>	
	<i>A. longirostre</i>	
<i>A. parkeri</i>		

Tabla 7. Continuación.

Especie de Rickettsia	Especie de Garrapata	País(es)
<i>R. rhipicephali</i>	<i>H. juxtakochi</i>	Brasil
<i>R. rickettsii</i>	<i>A. cajennense</i>	Argentina, Brasil, México, Panamá
	<i>A. aureolatum</i>	Brasil
	<i>D. variabilis</i>	Estados Unidos
	<i>D. andersoni</i>	
	<i>R. sanguineus</i>	Estados Unidos, México
	<i>A. imitator</i>	México
	<i>H. leporispalustris</i>	Costa Rica, Estados Unidos
	<i>A. americanum</i>	Estados Unidos
	<i>D. occidentalis</i>	
	<i>D. parumapertus</i>	
	<i>I. dentatus</i>	
Candidatus ' <i>R. andeanae</i> ' ^d	<i>A. parvum</i>	Argentina
	<i>A. pseudoconcolor</i>	
	<i>A. maculatum</i>	Perú
	<i>A. triste</i>	Chile
	<i>Ixodes boliviensis</i>	Perú
<i>Rickettsia</i> sp. ^e	<i>A. tigrinum</i>	Bolivia
<i>Rickettsia</i> 364D	<i>D. occidentalis</i>	Estados Unidos
<i>Rickettsia</i> sp. strain Argentina	<i>A. parvum</i>	Argentina
<i>Rickettsia</i> sp. strain Atlantic Rain Forest	<i>A. ovale</i>	Brasil
	<i>R. sanguineus</i>	
<i>Rickettsia</i> sp. strain Colombianensi	<i>A. dissimile</i>	Colombia
	<i>A. cajennense</i>	

^a Se incluyen *Rickettsia* sp. strain AL y strain ARANHA identificadas en Brasil

^b Reportada en documentos originales como *A. cooperi*

^c Se incluye *Rickettsia* sp. strain COOPERI y strain NOD identificadas en Brasil

^d Denominada en algunas referencias como *Rickettsia* sp. strain Argentina

^e Cercana a *R. aeschlimannii*

Fuente: adaptado de ([74](#), [76](#), [167-169](#)).

1.4. Rickettsiosis en Colombia.

La historia de las Rickettsiosis en Colombia se remonta a principios del siglo XX cuando en Tobia, Inspección de Policía del Municipio de Nimaima (Departamento de Cundinamarca), se reportaron varios brotes entre mayo y noviembre de 1935 de una entidad febril similar a Fiebre Amarilla y a Fiebre Tifoidea. Entre los años de 1934 y 1936 en esta Inspección, que según un censo de la época contaba con una población de 267 habitantes, 65 personas contrajeron esta enfermedad febril y sólo tres de ellas lograron recuperarse, evidenciando así sus altas tasas de letalidad (caso-letalidad:95,4%) y morbilidad (24,3%). El trabajo de epidemiología de campo evidenció algunas características del brote. La mayoría de los casos se concentraron en la población de jóvenes y niños (0-19 años de edad); los casos se presentaban en personas que cohabitaban; las personas y sus animales domésticos evidenciaron altos niveles de infestación por varios tipos de ectoparásitos, entre los que se cuentan garrapatas (*A. cajennense*, *D. nitens*, *R. sanguineus* y *Ornithodoros venezuelensis*), piojos (*Pediculus humanus*) y pulgas (*Ctenocephalides canis*); y en los alrededores de las viviendas no fue común el hallazgo de mosquitos vectores de Fiebre Amarilla (170).

En el mismo trabajo se registraron las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes. Los afectados describían signos iniciales, previos a la fiebre, como artralgias, mareo y malestar general. Posteriormente se observaba que la entidad evolucionaba a un cuadro febril (39-41,5°C) acompañado de mialgias, artralgias, escalofríos, náusea, vómito, congestión conjuntival, fotofobia, constipación y en casos avanzados, después de 4 días, signos neurológicos como estupor y delirio. Se describió que uno de los signos más característicos de la patología era la erupción dérmica, que iniciaba al tercer día y se expandía por todo el cuerpo, con pápulas rosadas a hemorrágicas y que al momento de la muerte se manifestaba como una erupción purpúrica en todo el cuerpo del paciente (170).

El trabajo del Dr. Patiño-Camargo y colaboradores, además de hacer una descripción epidemiológica y clínica muy detallada del brote, relata las posteriores investigaciones en laboratorio que llevaron a aclarar varios aspectos de la etiología de la enfermedad. Los investigadores realizaron varias pruebas biológicas en cobayos (*Cavia porcellus*) los cuales fueron inoculados con sangre de pacientes y macerados de algunos ectoparásitos encontrados (*Pediculus humanus*, *A. cajennense*, *R. sanguineus* y *Cimex hemipterus*). Los inóculos de sangre de pacientes produjeron cuadros febriles fatales y permitieron la visualización de organismos tipo *Rickettsia* en células endoteliales, mientras que los de artrópodos no produjeron ninguna reacción. Estos hallazgos confirmaron la presencia de una Rickettsiosis, similar a la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas de Estados Unidos y al Tifo Exantemático de Brasil, producidas por una *Rickettsia* y cuyo vector podrían ser garrapatas del género *Ornithodoros* u otro artrópodo asociado a la cama de los pacientes. La enfermedad fue denominada “Fiebre de Tobia” ([170](#)).

Después del registro del Dr. Patiño-Camargo transcurren algunos años sin nuevos reportes de la enfermedad. Sólo hasta el año de 1946 es registrado en los libros del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), un nuevo brote en el Valle de Surata (Santander) por Carlos Sanmartín ([171](#)) y un gran abismo temporal de incertidumbre (u olvido) nos lleva hasta inicios del nuevo milenio, cuando en el año 2001, Miranda y colaboradores, en un estudio de seroprevalencia en trabajadores rurales del Municipio de Ciénaga de Oro (Córdoba), reportan una serorreactividad total de 49% contra rickettsias del grupo SFG ([172](#)).

Para los años 2003 y 2004 ocurren dos casos fatales de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en el Municipio de Villeta (cercano a Tobia). El diagnóstico de ambos pacientes fue confirmado a través de inmunohistoquímica (IH), cultivo, PCR y secuenciación en la cual se corroboró, con un alto

porcentaje de homología, que el agente causal correspondía a *Rickettsia rickettsii*. En el mismo trabajo se colectaron garrapatas de las especies *A. cajennense* y *R. sanguineus* en los alrededores de las viviendas de los óbitos. Este reporte de caso se constituye por ende, después del trabajo de Patiño-Camargo en el año 1937, en la primera confirmación de muertes por RMSF en Colombia ([173](#)).

Un posterior trabajo analizó 64 muestras de sueros (años 2000-2004) correspondientes al Programa de Vigilancia de Enfermedades Febriles Transmitidas por Vectores. Entre otras etiologías, fueron analizadas muestras para *R. rickettsii* y *R. parkeri*, a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se encontró que un 4,3% de las muestras fueron seropositivas (anticuerpos clase IgG) para ambas especies y que todas provenían de los departamentos de Santander y Guaviare ([174](#)).

Para los años 2006 a 2008 fueron reportados brotes en tres zonas geográficas diferentes del país. En el año 2006 fue reportado un brote en el Municipio de Necoclí (Antioquia) en el que se evidenciaron 14 casos probables y 5 muertes (caso-letalidad:35,7%), de las cuales 4 fueron positivas por la técnica de IFI, 3 por inmuistoquímica a rickettsias del grupo SFG, y dos de éstas a *R. rickettsii* por PCR ([175](#)). Ulteriormente, entre febrero y marzo de 2007, en el Municipio de Los Córdoba (Córdoba) se reportaron 20 casos probables, de los cuales 4 fueron casos fatales confirmados por IH y 7 casos confirmados por IFI para rickettsias del grupo SFG (caso-letalidad:36,3%) ([176](#)). Finalmente, en el año 2008 se presentó otro brote en el Municipio de Turbo (Antioquia) con 15 casos probables, 6 confirmados por laboratorio a través de IFI, 4 casos fatales (caso-letalidad:26,6%) y el hallazgo de garrapatas *A. cajennense* y *R. sanguineus*, negativas a *Rickettsia* spp. por el test de hemolinfa ([171](#), [177](#)).

Dos encuestas serológicas desarrolladas en el Municipio de Villeta (Cundinamarca) después del brote, permitieron evidenciar los altos porcentajes de seropositividad en humanos y animales y corroborar su endemidad. Entre enero y febrero de 2005, un total de 371 sueros humanos fueron analizados para rickettsias del grupo SFG a través de IFI; 149 (40,3%) muestras fueron positivas a anticuerpos IgG con títulos que llegaron hasta 1:1.024 (178). Posteriormente, entre marzo y abril de 2009 se analizaron a través de IFI, 159 muestras de suero de equinos y 22 de caninos, provenientes de diversas veredas del Municipio; 4 (18,2%) muestras de caninos y 26 (16,3%) de equinos fueron positivas a rickettsias del grupo SFG (179).

Recientemente, en un trabajo desarrollado en los municipios de Montería y Los Córdoba (Córdoba), fueron colectadas garrapatas *Amblyomma dissimile* de iguanas (*Iguana iguana*) y larvas de *Amblyomma* sp. y *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* de pasturas. Estos especímenes amplificaron genes de *Rickettsia* spp. y sus secuencias tuvieron altos porcentajes de homología con *R. tamurae* y *R. monacensis*. Los autores proponen, a partir de los resultados obtenidos, nombrar a esta especie como *Rickettsia* sp. strain Colombianensi y recomiendan ampliar las investigaciones sobre las características de esta especie, su epidemiología y posible efecto patógeno en humanos y/o animales. Este estudio se constituye en el primer reporte de identificación molecular de bacterias del género *Rickettsia* en garrapatas en Colombia (168). Sin embargo, aún hay interrogantes respecto a la(s) especie(s) de garrapata(s) que podría(n) cumplir un papel en la transmisión de *Rickettsia* spp. en las áreas geográficas donde se ha identificado la enfermedad. Algunas investigaciones en curso, en las regiones donde se han detectado casos, es decir, en los departamentos de Antioquia, Córdoba y Cundinamarca, tiene como objeto avanzar en la identificación de la(s) especie(s) posiblemente involucradas.

Otro aspecto que aún debe ser estudiado en el ciclo epidemiológico de las Rickettsiosis en zonas endémicas de Colombia, es el papel de hospederos vertebrados como reservorios, hospederos de amplificación y/o centinelas de la enfermedad. Adicional a la investigación realizada por Hidalgo *et al.*(2009) en el cual se realizaron estudios de seroprevalencia en animales domésticos (179), debe mencionarse el trabajo hecho por Miranda *et al.*(2011) en el cual se hizo una encuesta serológica en capibaras (chigüiros) en el área rural de Montería (Córdoba). En este estudio, se obtuvo un 22% de seroprevalencia (8 de 36 animales) a anticuerpos tipo IgG de rickettsias del grupo SFG y fueron colectadas 933 garrapatas identificadas como *A. cajennense* de los chigüiros incluidos en el estudio. El trabajo, además de ser el primer reporte de infección natural por rickettsias en chigüiros en Colombia, postula su papel epidemiológico como centinelas en el área de estudio (180).

Hidalgo (2009) clasifica a las Rickettsiosis en Colombia como una enfermedad olvidada y no como una entidad emergente o re-emergente, ya que es claro que la enfermedad aún permanece como un agente endémico en las regiones donde ya se había encontrado. Explica además, las razones por las cuales la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (o Fiebre de Tobia) aún no es considerada en el diagnóstico diferencial de enfermedades febriles en nuestro país y lista las posibles causas. Como primero, una infraestructura inadecuada para el diagnóstico; en segundo lugar, la carencia de conocimiento de la enfermedad tanto en la población como en el personal de salud y como tercero, la presencia en Colombia de numerosos agentes (principalmente transmitidos por artrópodos) que producen síndromes febriles inespecíficos que son, al menos inicialmente, similares a las Rickettsiosis (171).

2. Capítulo 2. Objetivo específico 1: Identificación Molecular de Bacterias del Género *Rickettsia* en Muestras de DNA de Garrapatas Obtenidas en Diferentes Municipios de Antioquia, Córdoba y Cundinamarca Mediante PCR con el Uso de Iniciadores Específicos (Primers).

2.1. Descripción del Objetivo.

Como primer objetivo específico del trabajo, se buscó identificar genes del género *Rickettsia*, descritos previamente en la literatura, en muestras de DNA de garrapatas que habían sido colectadas en diferentes municipios de los departamentos de Antioquia, Córdoba y Cundinamarca donde habían sido diagnosticados casos de Rickettsiosis o se habían realizado estudios de casos probables.

2.2. Materiales y Métodos.

2.2.1. Garrapatas.

Entre los años 2005 y 2008 fueron colectadas garrapatas en los municipios de Villeta y La Peña (Cundinamarca); Turbo y Necoclí (Antioquia) y Los Córdoba (Córdoba). Todas las muestras fueron transportadas y almacenadas (secas y congeladas a -70°C) en la colección del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud de Colombia.

Los especímenes fueron obtenidos a través de toma directa de hospederos animales como equinos, bovinos, mulares, ovinos y caninos; y de paredes e instalaciones de los predios visitados.

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron 791 garrapatas de las especies *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Dermacentor nitens* y algunos especímenes identificados como *Amblyomma* sp. y otros sin determinación taxonómica por condiciones de la muestra o estadio (larvas, ninfas). En su

mayoría correspondían a adultos (machos y hembras) seguida en proporción por ninfas, larvas y algunas muestras de huevos.

Si bien el proceso de identificación taxonómica ya había sido ejecutado en trabajos previos, en el presente estudio fue realizado en 75 garrapatas adultas provenientes de los municipios de La Peña (Cundinamarca) y Necoclí (Antioquia). Dicha identificación fue ejecutada en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia y para ello fueron utilizadas claves taxonómicas dicotómicas para género y especie ([181-183](#)).

2.2.2. Extracción de DNA.

Para la extracción de DNA se conformaron pools de muestras bajo los siguientes criterios, en su orden: departamento, municipio, vereda, hospedero o lugar de toma, estadio, sexo (adultos), género y especie. El número de especímenes incluidos variaba, según el tipo de muestra y los criterios mencionados, entre 2 ó 7 con un límite determinado por el peso máximo de muestra recomendado por el estuche de extracción comercial (25 mg). Los especímenes adultos que se encontraban completos fueron cortados por mitades para la conservación de una contramuestra.

Una vez conformados los pools se procedió a hacer el macerado individual; para ello, las muestras contenidas en tubos de microcentrifuga (2,0 mL) fueron ubicadas en un baño serológico a 70°C durante 20 minutos para eliminar cualquier residuo de alcohol que pudiese interferir en los procesos subsiguientes. A continuación, cada muestra fue colocada sobre papel filtro estéril y cortada en finos fragmentos con una cuchilla de bisturí estéril. Los fragmentos se introdujeron en un tubo de microcentrifuga para adicionarle 40 µL de solución de PBS y triturarlos hasta degradar cualquier fragmento de la cutícula. El objetivo en este paso era obtener una solución con la

menor cantidad posible de tejido de garrapata para llevarlo a la extracción por columna (ver anexo).

El proceso de extracción por columna fue a través del uso de un estuche comercial para sangre y tejidos (DNeasy Tissue & Blood®, QIAGEN) con algunas modificaciones en el protocolo recomendado por el fabricante. En primer lugar, previo al uso de las soluciones incluidas, las muestras fueron sometidas a una lisis con isotiocianato de guanidina (DNAzol®, Invitrogen) (400 µL) y a un nuevo macerado. La solución obtenida fue centrifugada para iniciar el protocolo recomendado por el estuche desde la adición de etanol. Con ello, el uso del buffer ATL y de la proteinasa K fue obviado en esta primera fase. Al final del procedimiento se realizó una elución del DNA retenido en la columna a través de la adición de 55 µL del buffer AE con el fin de aumentar la concentración final del material genético (ver anexo).

El principio del método de extracción de DNA a través del uso de columnas consiste en la lisis de tejidos y células a través de la adición de sustancias como la proteinasa K y el buffer ATL para permitir la obtención del material genético. A partir de ello, el material pasa por la columna junto con soluciones amortiguadoras que facilitarán la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de la misma. En medio de esta fase, se usan además dos soluciones de lavado que permiten el paso de contaminantes y enzimas inhibitorias y purifican el DNA en la columna. Al final, se eluye el mismo a través de agua o en una solución amortiguadora para su congelación y almacenamiento ([184](#)).

El DNA obtenido fue almacenado en tubos eppendorf de 2,0 mL a -20 °C para posterior uso en los procesos medición de concentración, pureza y amplificación a través de PCR.

2.2.3. Medición de Concentración y Pureza.

Al DNA obtenido en el proceso de extracción, se le realizó una medición de concentración y pureza a través de espectrofotometría. Para ello, 2 μL de cada una de las muestras fue colocado en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000c $\text{\textcircled{R}}$, Thermo Scientific) para el registro de la concentración de DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y su pureza a través de la medición de la relación de absorbancia entre las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Durante el procedimiento de medición, después de cada lote de 10 muestras, se usaba nuevamente la solución blanco para calibrar el equipo y evitar errores en la lectura.

2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la identificación del material genético de bacterias del género *Rickettsia* en el DNA extraído de las garrapatas se usó una técnica convencional, estandarizada, de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Previo a la amplificación de los genes de *Rickettsia*, todas las muestras fueron sometidas a un tamizaje para identificar posibles inhibidores de amplificación y contaminantes, situación que ha sido reportada en procedimientos con material proveniente de estos artrópodos hematofágos ([185](#)). Para ello se realizó una PCR convencional que amplificase el gen *16S rRNA* mitocondrial de garrapatas a partir de una técnica previamente reportada en estudios de relación filogenética de ixódidos ([186](#)).

Las muestras que fueron positivas a la amplificación del gen mitocondrial de garrapata (sin aparentes sustancias inhibitorias de amplificación) fueron incluidas en un posterior análisis de identificación para el gen *gltA* del género *Rickettsia*, el cual es altamente conservado entre especies de los grupos TG y SFG. Las muestras positivas a este gen, se incluyeron en una ulterior amplificación de los genes *ompB* y *17kD* que son relevantes en la diferenciación de especies del grupo SFG. En la Tabla 8, se resumen las

secuencias de los iniciadores usados en los diferentes procesos de amplificación.

Tabla 8. Secuencias de iniciadores incluidos en el proceso de identificación molecular.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del Fragmento (pb)	Referencia
<i>16S rRNA*</i>				
Forward	16S +1	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT		
Reverse	16S -1	GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	460	(186)
<i>gltA</i>				
Forward	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT		
Reverse	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401	(162)
<i>ompB</i>				
Forward	120.M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC		
Reverse	120.807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	862	(16)
<i>17kD</i>				
Forward	17kD1	GCTCTTGCAACTTCTATGTT		
Reverse	17kD2	CATTGTCGTCAGGTTGGCG	434	(187)

* Gen mitocondrial de garrapatas usado para descartar inhibición de PCR.

Para cada reacción se realizó una mezcla con los siguientes reactivos: buffer de reacción (1x), cloruro de magnesio (MgCl₂) (2 mM), iniciadores (forward y reverse) (0,75 µM), mezcla de dNTP's (200 µM) y *Taq* Polimerasa (Invitrogen) (0,5 U/µL). Para cada muestra se adicionó un volumen de DNA equivalente a 100 ng, calculado a partir de los resultados de concentración. En todas las reacciones se completaba un volumen final de 25 µL a través de la adición de agua para PCR.

Como control positivo en la amplificación del gen *gltA*, se utilizó un plásmido que contenía un fragmento de este gen. Para las reacciones de los genes *ompB* y *17kD* fue utilizado DNA de *R. rickettsii* (cepa Sheila Smith) obtenido de células Vero infectadas (Grupo Microbiología INS). Como control negativo se usó agua para PCR en cada reacción.

Las reacciones de PCR se ejecutaron en un termociclador C1000® (Bio-Rad Laboratories) con los respectivos programas de amplificación previamente ajustados. Las condiciones para la realización de cada PCR se encuentran detalladas en los anexos.

Una vez finalizada la reacción, fue corrido el producto de amplificación en un gel de agarosa al 2,0% previamente teñido con bromuro de etidio. En cada corrido electroforético se incluyeron los correspondientes controles (positivo y negativo) y un marcador de peso molecular de 100 pb. Al finalizar este proceso, el gel fue revelado en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Gel Doc™ XR, Bio –Rad) para evidenciar las bandas de DNA compatibles en tamaño con el gen en estudio.

2.2.5. Secuenciación de Ácidos Nucléicos.

Las muestras positivas a la amplificación de los genes de *Rickettsia* en estudio (*gltA*, *ompB* y *17kD*) fueron seleccionadas para la secuenciación de ácidos nucleicos con el objetivo de identificar molecularmente la(s) especie(s) de *Rickettsia* involucradas.

Las muestras positivas a los genes de *Rickettsia*, seleccionadas para realizar la secuenciación, pasaron por una PCR previa que incluía un sistema de polimerasa de alta fidelidad (*Taq* polymerase system, Expand High Fidelity PLUS PCR System®; Roche). Adicionalmente, los productos de la amplificación o las bandas de interés extraídas de cada gel, derivados de esta reacción de PCR, fueron purificados usando un estuche comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System®; Promega Corp.), para eliminar posibles contaminantes (dímeros de nucleótidos) previo al proceso de secuenciación.

La secuenciación se hizo con el juego de iniciadores para los genes de *Rickettsia*, incluidos en la amplificación inicial, a una concentración de 3,5 ng/ μ L. El proceso fue a través de un sistema automatizado de electroforesis capilar y tipificación de fragmentos (3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems®, Life Technologies Corp.) ofrecido por un proveedor comercial externo.

2.2.6. Análisis de Secuencias.

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación se sometieron a un proceso de edición para identificar probables errores en nucleótidos específicos, eliminar fragmentos de secuencias erróneas y obtener una secuencia consenso que pudiese ser utilizada en los posteriores alineamientos. Este proceso se hizo a través del software BIOEDIT (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

La secuencia consenso de cada una de las muestras, fue sometida a un posterior alineamiento con secuencias de diversas especies de *Rickettsia*, almacenadas en la base de datos del GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), a través del uso de la herramienta básica de alineamiento BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Los resultados de identidad y cobertura fueron analizados con el fin de establecer homologías con secuencias de referencia.

2.3. Resultados.

2.3.1. Garrapatas.

En la Tabla 9 se resumen los géneros y las especies de garrapatas que fueron incluidas en el proceso de identificación molecular. En total, 791 especímenes de garrapatas de 3 géneros y 4 especies de la familia Ixodidae, además de algunos individuos clasificados como *Amblyomma* sp.

y otros no identificados, fueron incluidos en los posteriores procesos de extracción y amplificación de DNA (Tabla 9).

Al analizar los datos por origen geográfico se evidencia que la mayor proporción de individuos correspondieron a aquellos provenientes del Departamento de Cundinamarca (582/791; 73,3%), seguido por los obtenidos en los departamentos de Antioquia (112/791; 14,2%) y Córdoba (97/791; 12,3%).

Los especímenes de las garrapatas *Dermacentor nitens* y *Rhipicephalus sanguineus* fueron predominantes entre las muestras incluidas en el estudio, con un 39,2% (310/791) y un 37% (293/791), respectivamente. Por el contrario, las muestras correspondientes a *Amblyomma cajennense* (78/791; 9,9%) y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (69/791; 8,7%) fueron menor en número para las tres regiones.

Tabla 9. Géneros y especies de garrapatas incluidas en el proceso de identificación molecular de *Rickettsia* spp.

Género/Especie	Departamento			Total
	Antioquia	Córdoba	Cundinamarca	
<i>Amblyomma cajennense</i>	2	2	74	78
<i>Dermacentor nitens</i>	23	63	224	310
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	59	5	229	293
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	24	0	45	69
<i>Amblyomma sp.</i>	1	10	6	17
No Identificadas	3	17	4	24
TOTAL	112	97	582	791

Un total de 240 pools de garrapatas fueron conformados a partir de la aplicación de los criterios de agrupamiento definidos (Tabla 10). La mayor proporción de muestras correspondió a las provenientes del Municipio de

Villeta (Cundinamarca) (121/240; 50,4%) seguidas por la que fueron coletadas en los municipios de Necoclí (Antioquia) (58/240; 24,2%); Los Córdoba (Córdoba) (39/240;16,3%); La Peña (Cundinamarca) (20/240; 8,3%) y Turbo (Antioquia) (2/240; 0,8%).

Al analizar los resultados por origen de recolección de las muestras, es evidente el predominio de especímenes obtenidos de caninos (96/240; 40%) y equinos (84/240; 35%), seguidas por las correspondientes muestras de bovinos, mulares y paredes de los domicilios incluidos en la investigación de campo (Tabla 11).

Tabla 10. Pools conformados por origen geográfico (Municipio y Departamento).

Departamento	Municipio	Total Municipio	Total Departamento
Antioquia	Necoclí	58	60
	Turbo	2	
Córdoba	Los Córdoba	39	39
Cundinamarca	La Peña	20	141
	Villeta	121	
TOTAL			240

La mayor proporción de grupos correspondieron a garrapatas adultas (193/240; 80,4%) seguido por garrapatas en estadio de ninfas (15/240; 6,3%). Para algunas muestras de los municipios de Necoclí y Villeta debieron efectuarse mezclas de los estadios disponibles debido a que el número de especímenes obtenidos de un mismo origen geográfico y hospedero fue limitado. Ninguno de los grupos fue exclusivamente de larvas debido a que su número fue limitado en la colección. Entre los adultos, las muestras de hembras superaron significativamente a las de machos con un 65,7% (134/204) y 23% (47/204), respectivamente.

Tabla 11. Pools de garrapatas conformados por origen (hospedero animal o casa/domicilio).

Municipio	Nº Muestras	Bovino		Canino		Equino		Mular		Ovino		Pared		No Reportado	
Necoclí	58	14	24,1%	18	31,0%	18	31,0%	2	3,4%	-	-	-	-	6	10,3%
Turbo	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100,0%	-	-
Los Córdoba	39	3	7,7%	11	28,2%	18	46,2%	-	-	2	5,1%	-	-	5	12,8%
La Peña	20	-	-	2	10,0%	17	85,0%	1	5,0%	-	-	-	-	-	-
Villeta	121	21	17,4%	65	53,7%	31	25,6%	-	-	-	-	2	1,7%	2	1,7%
TOTAL	240	38	15,8%	96	40,0%	84	35,0%	3	1,3%	2	0,8%	4	1,7%	13	5,4%

Tabla 12. Pools de garrapatas conformados por estadio del ciclo de vida.

Municipio	Nº Muestras	Adulto		Ninfa		Larva		Huevos		Adulto, Ninfa		Larva, Ninfa, Adulto		No Determinado	
Necoclí	58	40	69,0%	2	3,4%	-	-	-	-	9	15,5%	1	1,7%	6	10,3%
Turbo	2	2	100,0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Los Córdoba	39	22	56,4%	7	17,9%	-	-	-	-	-	-	-	-	10	25,6%
La Peña	20	19	95,0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,0%
Villeta	121	110	90,9%	6	5,0%	-	-	1	0,8%	1	0,8%	-	-	3	2,5%
TOTAL	240	193	80,4%	15	6,3%	-	-	1	0,4%	10	4,2%	1	0,4%	20	8,3%

2.3.2. Detección Molecular.

A los 240 pools conformados, se les realizó el proceso de extracción de DNA y se obtuvieron concentraciones variables, que oscilaron entre los 10 y 600 ng/ μ L. Aunque en la mayoría de muestras logró hacerse una extracción correcta del material genético, se observaron 9 casos del Municipio de Villeta, en los cuales no fue exitosa por la escasa cantidad de muestra.

A partir de 231 muestras de DNA se inició el proceso de tamizaje para evaluar posible inhibición de amplificación. Un total de 204 (88,3%) muestras fueron positivas a la amplificación del gen *16S rRNA* mitocondrial de garrapata; las cuales, en su totalidad, fueron incluidas en los posteriores procesos de amplificación molecular de genes de *Rickettsia*, dada la baja probabilidad de inhibición en los procesos de polimerización.

De las 204 muestras positivas al gen *16S rRNA* mitocondrial, 15 (7,4%) amplificaron para el gen *gltA* y de éstas, 4 (26,7%) y 5 (33,3%) amplificaron para los genes *ompB* y *17 kD*, respectivamente. En la Tabla 13 se resumen los resultados de amplificación para tamizaje de inhibición y para los genes de *Rickettsia*, en cada una de las regiones incluidas en el estudio.

Tabla 13. Pools de garrapatas positivos a los genes *16S rRNA mit*, *gltA*, *ompB* y *17kD*, por origen geográfico.

Municipio	Total Muestras	<i>16S rRNA mit</i>		<i>gltA</i>		<i>ompB</i>		<i>17kD</i>	
		Nº positivos	% positivos	Nº positivos	% positivos	Nº positivos	% positivos	Nº positivos	% positivos
Necoclí	58	55	94,8%	-	-	-	-	-	-
Turbo	2	2	100,0%	1	50%	-	-	-	-
Los Córdoba	39	39	100,0%	-	-	-	-	-	-
La Peña	20	15	75,0%	7	47%	1	14%	1	14%
Villeta	112	93	83,0%	7	8%	3	43%	4	57%
TOTAL	231	204	88,3%	15	7,4%	4	26,7%	5	33,3%

De los lugares incluidos en el estudio, se detectó amplificación del gen *gltA* en los municipios de Villeta, La Peña y Turbo con 7 (66,6%) muestras para los dos primeros y 1 (6,7%) en el último. En relación al número de muestras analizadas en cada uno de los municipios, se obtuvo amplificación para el gen *gltA* en el 50% de las muestras de Turbo, 47% de La Peña y 8% de Villeta.

Para los genes *ompB* y *17 kD* se evidenció amplificación en muestras de los municipios de La Peña y Villeta (1 y 3 muestras para *ompB* y 1 y 4 muestras para *17kD*, respectivamente). De otra parte, el número de pools que fueron positivos simultáneamente a los genes *gltA* y *ompB* fueron 4 (Villeta, 3; La Peña, 1); para los genes *gltA* y *17kD*, 5 (Villeta, 4; La Peña, 1) y para los tres genes en estudio 4 (Villeta, 3; La Peña, 1).

Al analizar los resultados por especie de garrapata se evidenció amplificación para los tres genes de *Rickettsia* evaluados, en las especies *A. cajennense*, *R. sanguineus* y *D. nitens*. En el caso de las garrapatas de la especie *R. (B.) microplus*, sólo amplificó una muestra para el gen *gltA* y el mayor número de muestras con amplificación correspondió a la especie *D. nitens* con 7 (46,7%) pools para *gltA*, 2 (50%) para *ompB* y 3 (60%) para *17kD*. Por otro lado, las muestras que presentaron amplificación simultánea para los tres genes fueron 2 de *D. nitens* (Villeta), 1 de *A. cajennense* (Villeta) y 1 de *R. sanguineus* (La Peña) (Tabla 14).

Se obtuvieron resultados positivos de amplificación al gen *gltA* en muestras provenientes de equinos (12, 80%), caninos (1, 6,7%), bovinos (1, 6,7%) y colectadas de pared (1, 6,7%). Las muestras provenientes de equinos y caninos fueron las únicas en arrojar resultados positivos de amplificación para los tres genes en estudio. Cuando se analizan estos resultados de forma

simultánea, se evidencia positividad a los tres genes en 3 muestras de equinos (Villeta) y 1 muestra de caninos (La Peña) (Tabla 15).

Tabla 14. Pools de garrapatas positivos a los genes *16S rRNA mit*, *gltA*, *ompB* y *17kD*, por especie.

Especie Garrapata	Total Muestras	<i>16S rRNA mit</i>		<i>gltA</i>		<i>ompB</i>		<i>17kD</i>	
		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos	
<i>A. cajennense</i>	32	29	90,6%	5	17,2%	1	20,0%	1	20,0%
<i>R. sanguineus</i>	81	70	86,4%	2	2,9%	1	50,0%	1	50,0%
<i>D. nitens</i>	51	48	94,1%	7	14,6%	2	28,6%	3	42,9%
<i>R. (B.) microplus</i>	49	41	83,7%	1	2,4%	-	-	-	-
<i>Amblyomma sp.</i>	8	6	75,0%	-	-	-	-	-	-
<i>Sin Identificar</i>	10	10	100,0%	-	-	-	-	-	-
TOTAL	231	204	88,3%	15	7,4%	4	26,7%	5	33,3%

Tabla 15. Pools de garrapatas positivos a los genes *16S rRNA mit*, *gltA*, *ompB* y *17kD*, por origen de recolección.

Hospedero/Lugar	Total Muestras	<i>16S rRNA mit</i>		<i>gltA</i>		<i>ompB</i>		<i>17kD</i>	
		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos	
Equino	80	75	93,8%	12	16,0%	3	25,0%	4	33,3%
Canino	91	77	84,6%	1	1,3%	1	100,0%	1	100,0%
Bovino	38	30	78,9%	1	3,3%	-	-	-	-
Ovino	2	2	100,0%	-	-	-	-	-	-
Mular	3	3	100,0%	-	-	-	-	-	-
Pared	4	4	100,0%	1	25,0%	-	-	-	-
ND	13	13	100,0%	-	-	-	-	-	-
TOTAL	231	204	88,3%	15	7,4%	4	26,7%	5	33,3%

ND: No determinado

Las muestras de adultos fueron las únicas en las cuales se obtuvo amplificación a los genes de *Rickettsia* en estudio. Un total de 15 (9,2%) muestras amplificaron para el gen *gltA*, 4 (26,7%) para *ompB* y 5 (33,3%)

para *17kD*. 4 muestras amplificaron simultáneamente para los tres genes, 3 de Villeta y 1 de La Peña (Tabla 16).

Entre los pools de garrapatas adultas, los machos y hembras tuvieron igual número de amplificaciones positivas para el gen *gltA* (7; 46,6%), no obstante, para los genes *ompB* y *17kD* el número de muestras positivas fue mayor en machos (2 y 3, respectivamente) respecto a las hembras (1 y 1, respectivamente) (Tabla 17).

Tabla 16. Pools de garrapatas positivos a los genes *16S rRNA mit*, *gltA*, *ompB* y *17kD*, por estadio.

Estadio	Total Muestras	<i>16S rRNA mit</i>		<i>gltA</i>		<i>ompB</i>		<i>17kD</i>	
		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos	
Adulto	188	162	86,6%	15	9,2%	4	26,7%	5	33,3%
Ninfa	14	12	85,7%	-	-	-	-	-	-
Larva	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Huevos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adulto-Ninfa	9	9	100,0%	-	-	-	-	-	-
Larva-Ninfa-Adulto	1	1	100,0%	-	-	-	-	-	-
ND	19	20	100,0%	-	-	-	-	-	-
TOTAL	231	204	88,3%	15	7,4%	4	26,7%	5	33,3%

Tabla 17. Pools de garrapatas positivos a los genes *16S rRNA mit*, *gltA*, *ompB* y *17kD*, por sexo.

Sexo	Total Muestras	<i>16S rRNA mit</i>		<i>gltA</i>		<i>ompB</i>		<i>17kD</i>	
		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos		Nº positivos	
Macho	45	39	88,6%	7	17,5%	2	28,6%	3	42,9%
Hembra	132	112	84,8%	7	6,3%	1	14,3%	1	14,3%
Macho-Hembra	21	21	100,0%	1	4,8%	1	100,0%	1	100,0%
ND	6	7	100,0%	-	-	-	-	-	-
TOTAL	204*	179	87,7%	15	8,4%	4	26,7%	5	33,3%

*No se incluyen las ninfas (14) y especímenes no determinados que no fuesen adultos (13)

2.3.3. Secuenciación.

Trece muestras fueron incluidas en el proceso de purificación y secuenciación para la identificación de las especies de *Rickettsia*. Todas amplificaron para el gen *gltA*, 4 para el gen *ompB* e igual número para el gen *17 kD*. Del total de pools incluidos, 6 correspondieron a muestras de La Peña, el mismo número para Villeta y una muestra de Turbo. Adicionalmente, 10 de las muestras fueron de equinos y las restantes correspondieron a muestras individuales de caninos, bovinos y pared del domicilio.

En la Tabla 18 se resumen los datos más relevantes de las muestras incluidas en el proceso de secuenciación. De las 13 muestras procesadas, 2 amplificaron secuencias con homología a especies de *Rickettsia*. Ambas correspondieron a machos de garrapatas de la especie *Dermacentor nitens* colectadas de equinos en el Municipio de Villeta. En primer lugar, la muestra VP-8 que tuvo una homología de 99% con la especie *R. rickettsii* (cepa Sheila Smith, N° de acceso: CP000053.1) en la secuencia del gen *17kD*; y en segundo, la muestra VP 25 que tuvo una homología de 99% con la especie *R. felis* (URRWXCal2, N° de acceso: CP000053.1) en la secuencia del gen *gltA*. Ambas muestras fueron incluidas en los posteriores análisis de relación filogenética.

2.4. Discusión.

La distribución de las especies de garrapatas incluidas en el proceso de identificación molecular de este estudio evidencian una predominancia de especies como *D. nitens* y *R. sanguineus*. Esta situación puede ser explicada en gran medida por el alto número de hospederos, equinos y caninos, de los cuales se obtuvieron muestras de ectoparásitos. Ambas especies de artrópodos tienen cierta especificidad por su hospedero primario o final. *D. nitens* al ser una garrapata de un hospedero desarrolla todas sus fases parasíticas (larva, ninfa y adulto) en un solo vertebrado que comúnmente corresponde a équidos (34). De otro lado, *R. sanguineus*, a pesar de ser

una garrapata de tres hospederos, con estadios larvarios y ninfales que pueden desarrollarse en roedores y otros pequeños mamíferos, tiene como hospedero primario o final al perro doméstico, quien juega un papel esencial para el mantenimiento de altas poblaciones de este artrópodo (91).

Otro hallazgo a destacar es la preponderancia de muestras provenientes del Departamento de Cundinamarca y más específicamente del Municipio de Villeta. Esto es explicado porque además de las muestras colectadas en medio del proceso de investigación epidemiológica de campo cuando se presentaron los casos fatales, fueron tomados especímenes adicionales en gran número, durante la ejecución de un proyecto de investigación en este Municipio en los años posteriores a la presentación de los fallecimientos. Cabe resaltar también los resultados positivos de amplificación en muestras provenientes del Municipio de La Peña (Cundinamarca), el cual se ubica al norte de Villeta, pertenece a la misma provincia (Provincia del Gualivá) y en el cual se han evidenciado casos clínicos compatibles (171).

Es relevante la proporción de garrapatas adultas obtenidas en los muestreos de campo debido a su potencial vectorial y de mantenimiento a largo plazo de especies de *Rickettsia*. Sin duda el tamaño que pueden alcanzar los adultos y más específicamente las hembras (teleoginas) ingurgitadas en su última fase del proceso de alimentación facilita de sobremanera su obtención desde los hospederos animales infestados. El hecho de no contar con larvas en la colección, que pudiesen haber sido incluidas en el proceso de identificación molecular limita en parte la asociación de este estadio con posibles procesos de infección por *Rickettsia* y con su potencial vectorial. Es reconocido que las larvas como estadio no parasítico en espera de hospedero tiene comportamientos agresivos de ataque en masa a los hospederos susceptibles, característica que ha sido documentada ampliamente en infestaciones a humanos por *A. cajennense* y que podría explicar, en parte, un alto potencial vectorial (76).

Un 7,4% de las muestras incluidas en la detección molecular para el gen *gltA* fueron positivas a la amplificación, sugiriendo la presencia de bacterias del género *Rickettsia* en estas muestras. Este porcentaje es similar al obtenido con el mismo gen en otros estudios en diferentes zonas de Colombia como Córdoba con un 4,6% ([188](#)) y Antioquia con un 10% ([189](#)), aunque por debajo de resultados como los detectados en Panamá (55%) ([190](#)) y Brasil (47,5%) ([162](#)).

El porcentaje de detección de los genes *ompB* y *17kD* en las muestras positivas al gen *gltA* fue de 26,7% y 33,3%, respectivamente. Estos genes son conservados en la mayoría de especies del género y no permiten diferenciar a las especies dentro del grupo SFG de forma única, con lo cual exige la confirmación con secuenciación y análisis de filogenia.

Solo se detectó material genético de *Rickettsia* en las muestras de adultos debido a que fue el estadio predominante en los muestreos de las regiones involucradas. Tanto machos como hembras fueron positivos a la detección, aunque visto de forma proporcional fue mayor el número de machos positivos al gen *gltA* (7/39; 17,5%) frente al de hembras (7/112; 6,3%), al igual que en los genes *ompB* y *17kD*. En parte, esto puede ser explicado por la mayor probabilidad de contacto de los machos con un animal infectado con *Rickettsia* por el proceso de desplazamiento activo entre hospederos, aspecto que ha sido estudiado en los procesos de transmisión intraestadial de otros géneros del orden Rickettsiales y piroplasmas ([191-193](#)).

El número reducido de secuencias obtenidas al final del proceso, se debió a que algunas de éstas no tuvieron electroferogramas que pudiesen ser editados para obtención de secuencias consenso y para el posterior análisis de homología. Lo anterior pudo deberse a errores en los procesos de amplificación, de purificación o de preparación de muestras previo a la amplificación e incluso a la secuenciación misma.

Una de las secuencias obtenidas, correspondiente a la amplificación del gen *17kD* de la muestra VP8, fue procedente de un pool de garrapatas (macho) de la especie *Dermacentor nitens* colectadas de un equino de la Vereda Cune del Municipio de Villeta. Ésta tuvo una homología de 99% con la especie *R. rickettsii* (cepa Sheila Smith) y homologías semejantes con otras especies del Grupo SFG. La segunda secuencia obtenida correspondió a la amplificación del gen *gltA* de la muestra VP25, procedente de un pool de garrapatas (macho) de la especie *Dermacentor nitens* colectadas de un equino de la Vereda La Mazata del Municipio de Villeta. La misma tuvo una homología de 99% con una de las secuencias de referencia de la especie *R. felis* (URRWXCa2).

Estos hallazgos evidencian la posible circulación de ambas especies en este artrópodo y posiblemente en el hospedero involucrado. No obstante, debido a la baja capacidad de discriminación de estos marcadores al interior de los grupos de especies, es relevante el posterior análisis de relación filogenética para tratar de inferir su ubicación y relación.

Tabla 18. Muestras de garrapatas incluidas en el proceso de secuenciación de especies de *Rickettsia*.

Muestra N° (Id)	Municipio	Hospedero/Lugar	Especie Garrapata	Estadio	Sexo	Homología (%) (Número de Acceso)		
						<i>gltA</i>	<i>ompB</i>	17kD
1 (LPP1)	La Peña	Equino	<i>A. cajennense</i>	Adulto	Hembra	-	-	-
2 (LPP2)	La Peña	Equino	<i>A. cajennense</i>	Adulto	Macho	-	-	-
3 (LPP3)	La Peña	Equino	<i>A. cajennense</i>	Adulto	Macho	-	-	-
4 (LPP4)	La Peña	Equino	<i>A. cajennense</i>	Adulto	Macho	-	-	-
5 (LPP7)	La Peña	Equino	<i>D. nitens</i>	Adulto	Hembra	-	-	-
6 (P18)	La Peña	Canino	<i>R. sanguineus</i>	Adulto	ND	-	-	-
7 (VP6)	Villeta	Equino	<i>D. nitens</i>	Adulto	Hembra	-	-	-
8 (VP8)	Villeta	Equino	<i>D. nitens</i>	Adulto	Macho	-	-	99%- <i>R. rickettsii</i> <i>Sheila Smith</i> (CP000848.1)
9 (VP89)	Villeta	Bovino	<i>R.(B.) microplus</i>	Adulto	Hembra	-	-	-
10 (P13)	Villeta	Equino	<i>A. cajennense</i>	Adulto	Macho-Hembra	-	-	-
11 (P17)	Villeta	Equino	<i>D. nitens</i>	Adulto	Macho-Hembra	-	-	-
12 (VP25)	Villeta	Equino	<i>D. nitens</i>	Adulto	Macho	99%- <i>R. felis</i> URRWXCal2, (CP000053.1)	-	-
13 (TP1)	Turbo	Pared/Domicilio	<i>R. sanguineus</i>	Adulto	Hembra	-	-	-

3. Capítulo 3. Objetivo Específico 2: Establecer Relaciones Filogenéticas entre las Especies de *Rickettsia* Identificadas.

3.1. Descripción del Objetivo.

Como segundo objetivo específico del trabajo, se buscó establecer relaciones filogenéticas de las especies de *Rickettsia* que fueron identificadas a través de la secuenciación y alineamiento, por medio de diferentes modelos y métodos de inferencia y de construcción de árboles.

3.2. Materiales y Métodos.

3.2.1. Secuencias.

Para el desarrollo de este objetivo, fueron analizadas las dos secuencias correspondientes a las muestras VP8 y VP25 que amplificaron para los genes *17kD* y *gltA*, respectivamente. Las secuencias usadas en el análisis fueron las consenso, obtenidas después del proceso de edición y corroboradas a través de la herramienta BLAST® (ver anexo).

Para hacer el alineamiento múltiple, previo a la construcción de los árboles filogenéticos, se seleccionaron secuencias del GenBank® de diversas especies de *Rickettsia*. Los criterios de selección de las secuencias, en su orden, fueron los siguientes:

- Secuencias obtenidas de genomas completos, respaldados con publicación científica.
- Secuencias obtenidas de genomas completos, no respaldados con publicación científica.
- Secuencias obtenidas de aislamientos identificados, respaldados o no con publicación científica.

Adicionalmente, se incluyeron secuencias de especies de los diversos grupos, es decir, Grupo de las Fiebres Manchadas (SFG), Grupo del Tifo (TG), Grupo

Ancestral (AG) y Grupo Transicional (TG) con cepas reconocidas, reportadas en la literatura de referencia.

El alineamiento de las secuencias se ejecutó usando el algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) ofrecido por el Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (188, 189). El proceso de alineamiento múltiple usó 30 y 34 secuencias para los genes *gltA* y *17kD*, respectivamente, adicionales a las secuencias objeto de estudio (ver anexos).

3.2.2. Análisis de Relación Filogenética.

Para la construcción de los árboles para la inferencia de la relación filogenética de las especies de *Rickettsia* objeto de estudio, se seleccionaron tres métodos con el objetivo de corroborar las posibles relaciones de las secuencias obtenidas con otras especies del género.

Los métodos seleccionados para la inferencia de la relación filogenética fueron: Neighbor-Joining con el modelo de medición de la distancia-p (190); Maximum Likelihood basado en el modelo de Tamura Nei (191) y Maximum Parsimony, a través del cálculo con el algoritmo Close-Neighbor-Interchange (198). Los mismos fueron seleccionados por ser métodos robustos y porque han sido usados en otros estudios de relación filogenética de especies de *Rickettsia*.

Para la construcción de todos los árboles, se calcularon los valores bootstrap para 1000 replicas y se representaron gráficamente los resultados consenso del cálculo. Los análisis y construcción de todos los árboles obtenidos fueron ejecutados en el software MEGA5 (versión 5.2.2) (18).

En la construcción de los árboles se usaron como especies de referencia para la separación de clados (outgroup) a las pertenecientes al Grupo Ancestral (GA), es decir *R. bellii* y *R. canadensis*.

3.3. Resultados.

3.3.1. Análisis de Relación Filogenética con el Gen 17 kD.

En la Figura 9 se ilustra el árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias parciales del gen 17 kD de diversas especies de *Rickettsia* alineadas simultáneamente con el método Neighbor-Joining. La secuencia del estudio, correspondiente a la secuencia VP8, se ubicó en un clado definido con especies del grupo SFG (bootstrap, 99%) el cual incluye especies como *R. rickettsii* (cepas Sheila Smith, Hino, Colombia, Hauke, Hlp2, Arizona, Brazil y Iowa), *R. philipii* (364D), *R. slovacca* (D-CWPP y 13B), *R. parkeri* (Portsmouth), *R. conorii* (Malish 7), *R. peacockii* (Rustic), *R. sibirica*, *R. honei* (RB), *R. amblyommii* (GAT 30V), *R. africae* (ESF5), *R. japonica* (YH), *R. heilongjiangensis* (054), *R. montanensis* (OSU 85-930), *R. rhipicephali* (3-7) y *R. massiliae* (MTU 5).

En el mismo árbol es notoria la diferenciación de otros clados como el que agrupa las especies *R. akari* (Hartford) y *R. australis* (Cutlack); el de las especies *R. prowazekii* (Breinl) y *R. typhi* (Wilmington, B9991 CWPP y TH1527); y por último el que agrupa las especies *R. canadensis* (CA410, McKiel) y *R. bellii* (OSU 85389 y RML 369-C).

El árbol derivado del análisis por el método Maximum Likelihood ubica a la secuencia VP8 con otras especies del grupo SFG (bootstrap, 91%), similar a lo observado con el método Neighbor-Joining. Aquí, los clados de las especies del Grupo Transicional (exceptuando *R. felis*) y del Tifo se diferencian de forma evidente de las especies del grupo SFG (Figura 10).

En la Figura 11, puede observarse el árbol derivado del análisis con el método Maximum Parsimony. En éste, la secuencia VP8 se relaciona con otras especies del Grupo de las Fiebres Manchadas (bootstrap, 86%) y se evidencian de forma clara los clados de las especies del Grupo Ancestral y del Tifo.

3.3.2. Análisis de Relación Filogenética con el Gen *gltA*.

El árbol derivado del análisis con el método Neighbor-Joining (distancia-P) evidencia la relación de la secuencia VP25 con otros aislamientos de *R. felis* (Arica, LI16, *GltA* gene, URRWXCal2, CfCR) (bootstrap, 99%) y su ubicación dentro de un clado con las especies *R. akari* y *R. australis*, correspondientes al Grupo transicional. En el árbol, se diferencian también los grupos de especies de las Fiebres Manchadas, del Grupo del Tifo y del Grupo Ancestral (Figura 12).

En la Figura 13, se ilustra la relación filogenética analizada por el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei. La secuencia VP25 se ubica en un mismo clado con los aislamientos de *R. felis* incluidos en el análisis (bootstrap, 99%) y a su vez dentro del clado de las especies del Grupo Transicional. Al igual que en el método anterior, se diferencian los clados de los demás grupos, aunque el correspondiente al grupo SFG no se separa claramente de los demás.

Con el método de Maximum Parsimony se obtuvo un árbol de relación filogenética (Figura 14) que ubica a la secuencia VP25 entre las demás secuencias de *R. felis* (bootstrap, 99%) pero separada del clado de las especies del Grupo Transicional (*R. akari* y *R. australis*). Los clados de los demás grupos (Tifo, Fiebres Manchadas y Ancestral) se diferencian claramente, aunque la localización cambia respecto a los demás métodos descritos.

3.4. Discusión.

Para el caso de la secuencia VP8 es evidente que los tres modelos soportan, con valores bootstrap que oscilan entre 86% y 99%, la relación filogenética de la muestra con otras especies del Grupo de las Fiebres Manchadas entre las que se incluyen *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, entre otras. Esto corrobora que en la muestra, proveniente de machos de la especie *D. nitens*, colectados de un equino, circuló una especie relacionada con el grupo SFG.

Diversos estudios han evidenciado la circulación de *R. rickettsii* y/o de otras especies del grupo SFG en el Municipio de Villeta. En el reporte hecho por Hidalgo y colaboradores de los fallecimientos registrados en el Municipio de Villeta entre los años 2003 y 2004, se identificó a la especie *R. rickettsii* a través de un análisis de homología de secuencias obtenidas después de la amplificación de los genes *gltA*, *ompA*, *ompB* y *17kD* de DNA proveniente de tejidos. En la paciente N° 1, correspondiente a una mujer de 32 años, pudo obtenerse una secuencia del gen *17kD* que tuvo una homología de 100% con *R. rickettsii* (cepa Sheila Smith) y alrededor de su domicilio se colectaron diversas especies de garrapatas de la familia Ixodidae, entre las que se destacan 7 especímenes de *D. nitens* ([173](#)).

Resultados recientes de un proyecto de investigación que se encuentra en curso en el mismo Municipio y que busca caracterizar aspectos relacionados con la ecoepidemiología de las Rickettsiosis y su relación con una especie de garrapata, evidencian la amplificación de DNA de *Rickettsia* por el gen *gltA* en una hembra de la especie *D. nitens* colectada en un equino en la Vereda Balsal (Villeta) durante el año 2012 ([200](#)) y la obtención de una secuencia con una homología de 99,5% con *R. rickettsii* (cepa Sheila Smith), correspondiente a un pool de tres machos de *D. nitens* obtenidos de un equino de la Vereda Salitre Negro (Villeta) (Faccini-Martínez *et al.* sin publicar).

Otros estudios, hechos en Panamá, lograron identificar material genético en garrapatas *D. nitens* colectadas de equinos con alta homología con las especies *R. rickettsii* ([139](#)) y con el *R. amblyommii* ([139](#), [142](#), [190](#)).

La posible circulación de este tipo de rickettsias en equinos de Villeta ha sido demostrada de forma indirecta por análisis serológicos. En el trabajo hecho por Hidalgo y colaboradores en el año 2009, se obtuvo una seropositividad de 16,3% en 159 equinos de 13 veredas, a anticuerpos IgG contra especies del grupo SFG ([179](#)). En estudios recientes, se ha evidenciado que esta dinámica se ha mantenido a través de los años y que los equinos permanecen con una serorreactividad significativa (Faccini-Martínez *et al.* sin publicar).

Los equinos son importantes en la epidemiología de las Rickettsiosis. Se ha demostrado que pueden cumplir un rol relevante como centinelas de la Fiebre de las Montañas Rocosas al mantener un contacto con la vegetación, en potreros o zonas boscosas, facilitando así el contacto con garrapatas y la diseminación de las mismas debido a sus largos desplazamientos ([201](#)). En Brasil, por ejemplo, se han demostrado porcentajes de serorreactividad cercanas a 80% para especies del grupo SFG en zonas endémicas, lo que demuestra su importancia epidemiológica ([202](#), [203](#)).

El papel que podría cumplir *D. nitens* en la transmisión a humanos de *R. rickettsii* o de otras especies del grupo SFG, podría tener poca relevancia debido a que es una especie que raramente parasita a este hospedero. En Suramérica se han registrado 4 reportes de ataques a humanos: uno en Bolivia, otro en Brasil y dos en Colombia (Maní-Boyacá^a y Bogotá D.C.) registrados en la década del 40 ([94](#)) y recientemente algunos reportes en diferentes estados de Brasil ([204](#)).

^a Actualmente perteneciente al Departamento de Casanare.

La baja probabilidad de infestación a humanos podría explicarse en parte por dos motivos: el primero es que esta especie tiene como hospedero primario al caballo y a otros équidos y en muy raras ocasiones infesta a otros mamíferos (domésticos o silvestres); el segundo es que esta garrapata cumple sus dos mudas (larva a ninfa y ninfa a adulto) en un solo hospedero, con lo cual reduce su rango de vertebrados parasitados.

Los árboles filogenéticos resultantes del análisis filogenético con los diferentes modelos y métodos aplicados, relacionan a la secuencia VP25 con diversos aislamientos de la especie *R. felis*, soportado con valores de bootstrap de 99% para los tres casos. Esto corrobora la presencia de esta especie en el artrópodo y/o en el equino involucrado.

La infección por *R. felis* en humanos produce una enfermedad conocida como Fiebre Manchada Asociada a Pulgas o Tifo de la Pulga del Gato (Flea-borne Spotted Fever, Cat Flea-Typhus), la cual es una enfermedad infecciosa emergente de distribución mundial, cuyo vector biológico primario es la "Pulga del Gato" (*Ctenocephalides felis*). No obstante, esta bacteria ha sido detectada en más de 12 especies de pulgas, 8 especies de garrapatas al igual que en ácaros y piojos ([205-207](#)). Las especies de garrapatas en las cuales se ha detectado material genético de esta especie de *Rickettsia* son: *Haemaphysalis flava*, *H. kitaokai*, *H. sulcata*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *Ixodes granulatus*, *I. ovatus* y *Carios capensis* ([74](#), [206](#)).

La detección de *R. felis* en garrapatas de la especie *D. nitens* no ha sido registrada hasta el momento en la literatura científica. En un estudio realizado por Cardoso y colaboradores en el 2006, se demuestra el hallazgo de material genético de esta especie de *Rickettsia* en garrapatas *A. cajennense* colectadas en caballos en un municipio de baja transmisión de rickettsias del Estado de Minas Gerais (Brasil) ([208](#)).

La circulación de la especie *R. felis* en la región del Municipio de Villeta ha sido demostrada de forma indirecta, a través de la descripción de un caso clínico de un adolescente de 16 años con un cuadro febril secundario a la infección por *R. felis*, confirmado por la seroconversión a esta especie ([209](#)).

La presencia de *R. felis* en *D. nitens* no incrimina a esta especie de garrapata como posible vector. Su hallazgo podría deberse a la presencia de la bacteria en el intestino del artrópodo después de un proceso de hematofagia en el equino, aspecto que ha sido hipotetizado como un proceso de transmisión horizontal desde el vector biológico primario (*C. felis*) hasta otro artrópodo, por medio de la alimentación en un hospedero vertebrado ([210](#)). El papel que podría jugar el equino en esta dinámica no sería relevante, al no ser un hospedero común para esta especie de pulga, no obstante, el escenario no podría descartarse totalmente debido al amplio rango de hospederos de *C. felis* y a reportes aislados de infestación en caballos jóvenes y adultos ([211](#)).

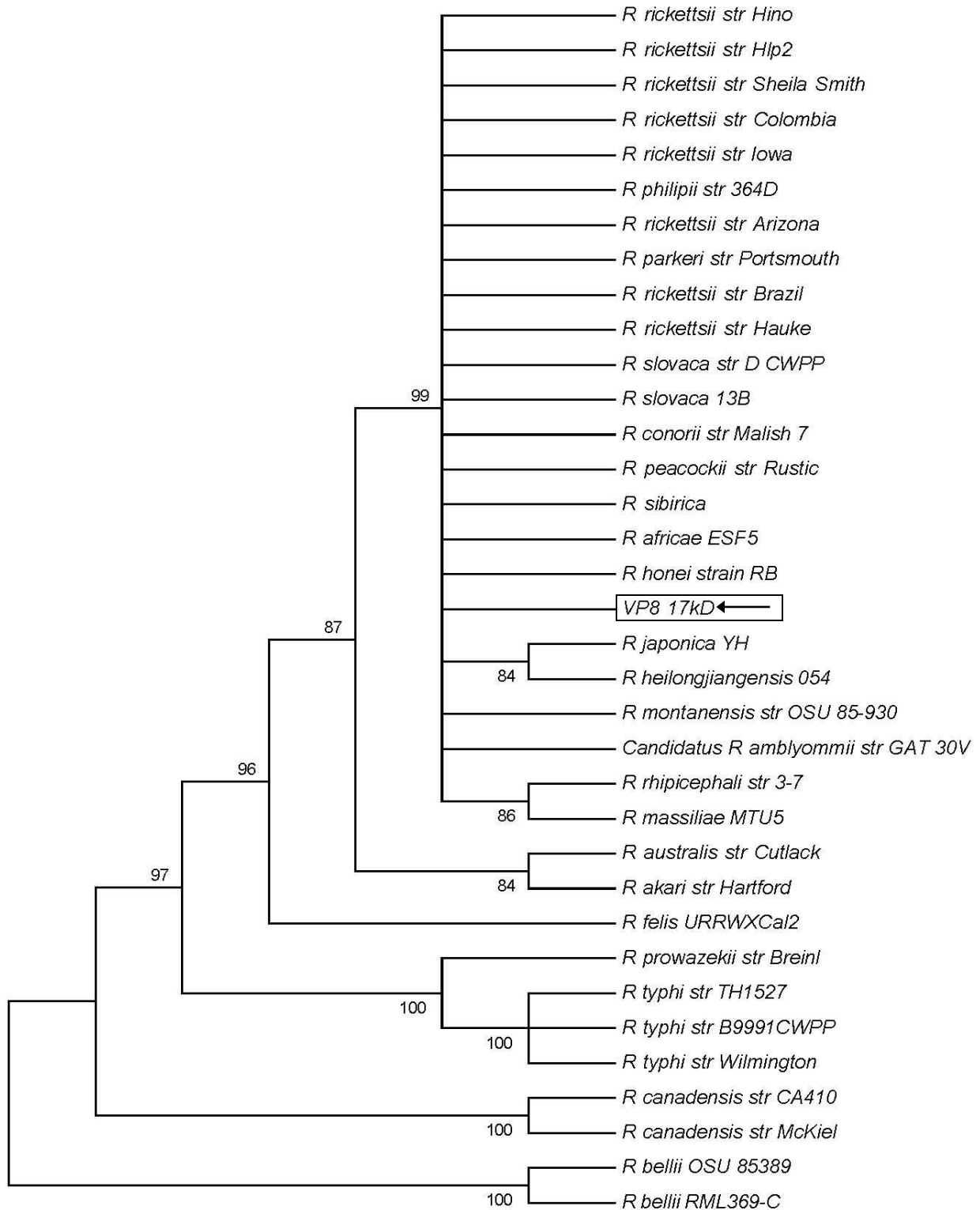


Figura 9. Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining (distancia-P) basado en secuencias parciales del gen 17kD y que evidencia la posición de la secuencia VP8 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. Se muestran los valores de bootstrap ($\geq 80\%$) para los grupos filogenéticos formados.

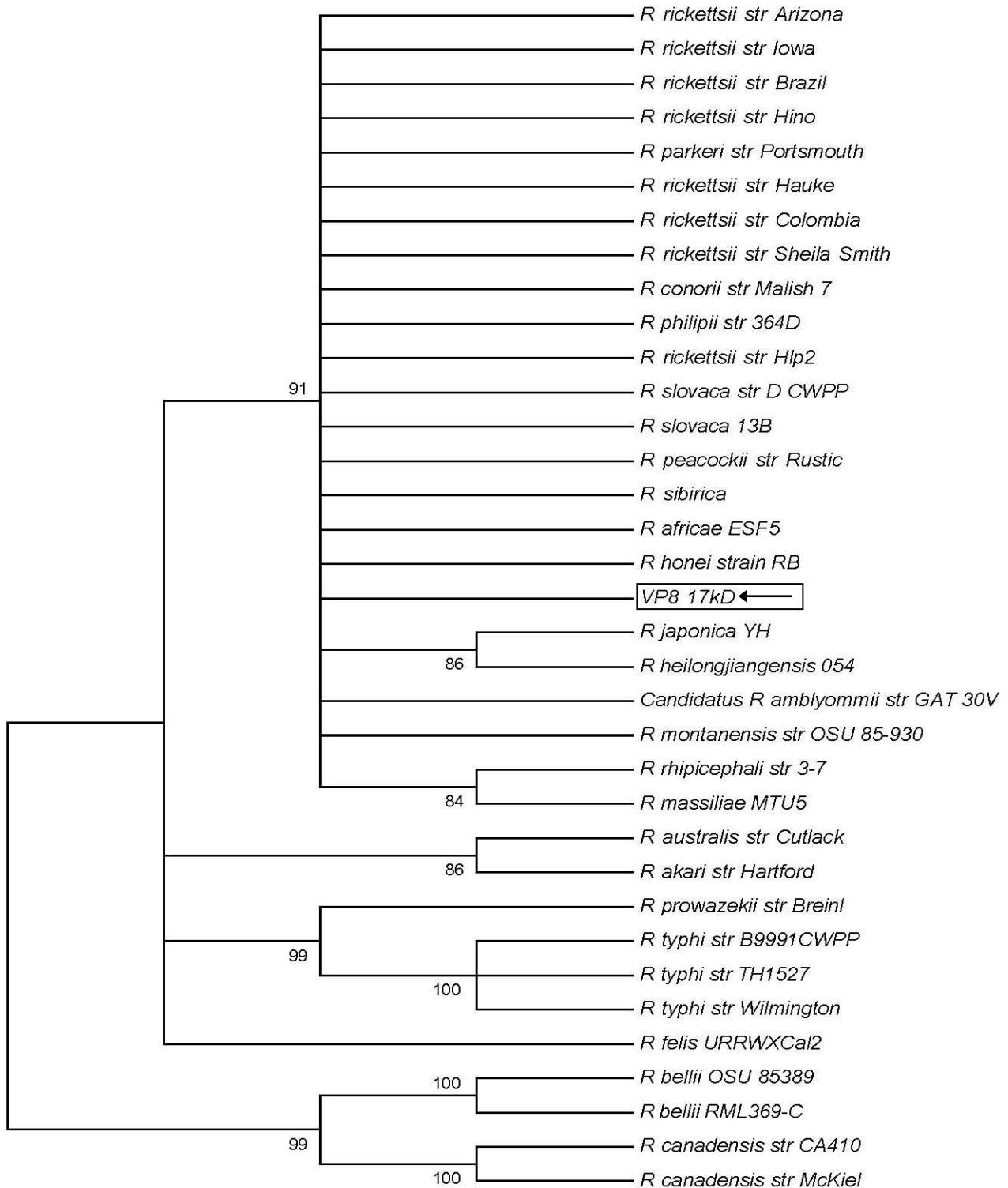


Figura 10. Árbol filogenético construido por el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei y en secuencias parciales del gen 17kD, que evidencia la posición de la secuencia VP8 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. Se muestran los valores de bootstrap ($\geq 80\%$) para los grupos filogenéticos formados.



Figura 11. Árbol filogenético construido por el método de Maximum Parsimony basado en secuencias parciales del gen *17kD* y que evidencia la posición de la secuencia *VP8* (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. Se muestran los valores de bootstrap ($\geq 80\%$) para los grupos filogenéticos formados.

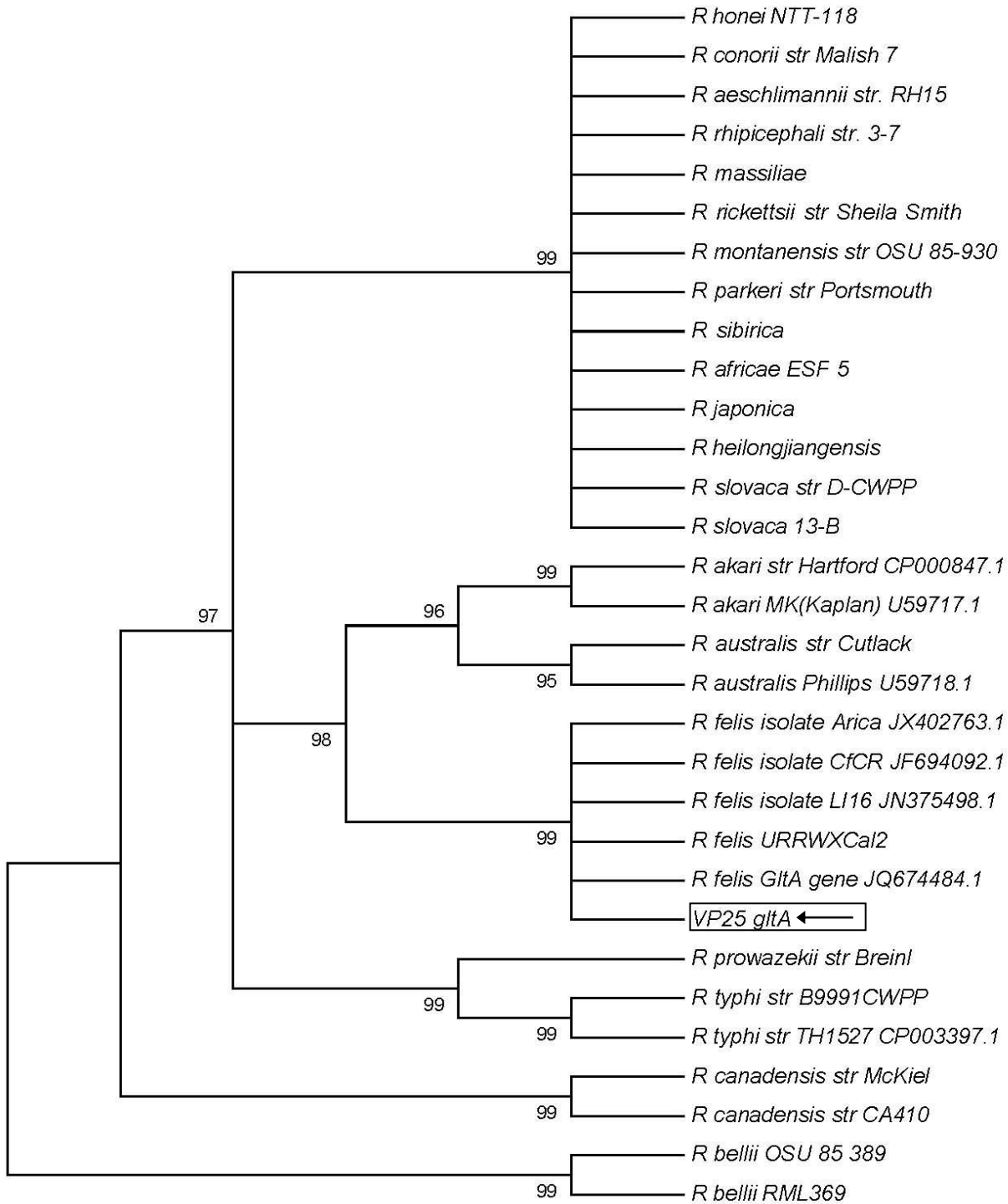


Figura 12. Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining (distancia-P) basado en secuencias parciales del gen *gltA* y que evidencia la posición de la secuencia VP25 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. Se muestran los valores de bootstrap ($\geq 80\%$) para los grupos filogenéticos formados.

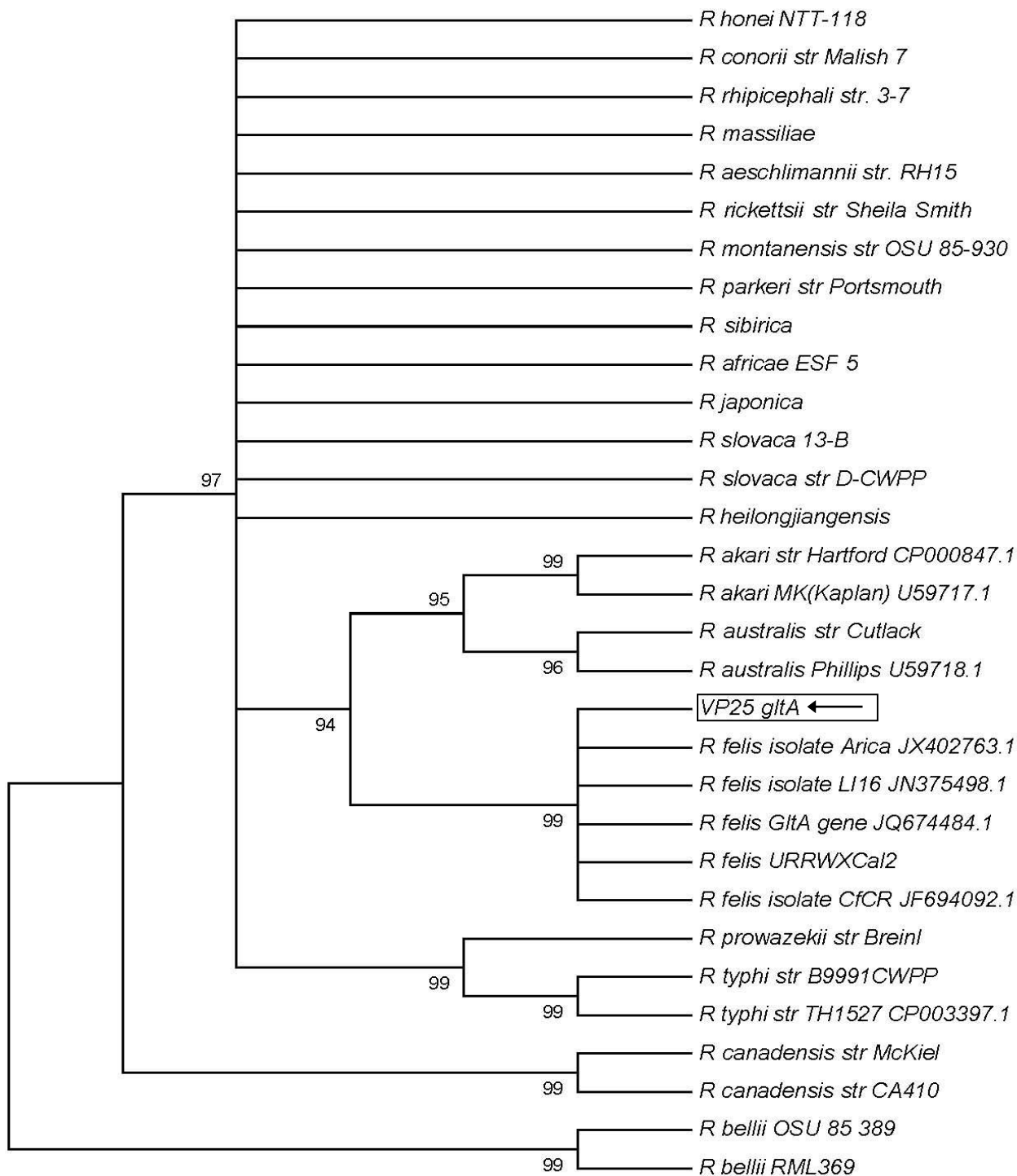


Figura 13. Árbol filogenético construido por el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-Nei y en secuencias parciales del gen *gltA*, que evidencia la posición de la secuencia VP25 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. Se muestran los valores de bootstrap ($\geq 80\%$) para los grupos filogenéticos formados.

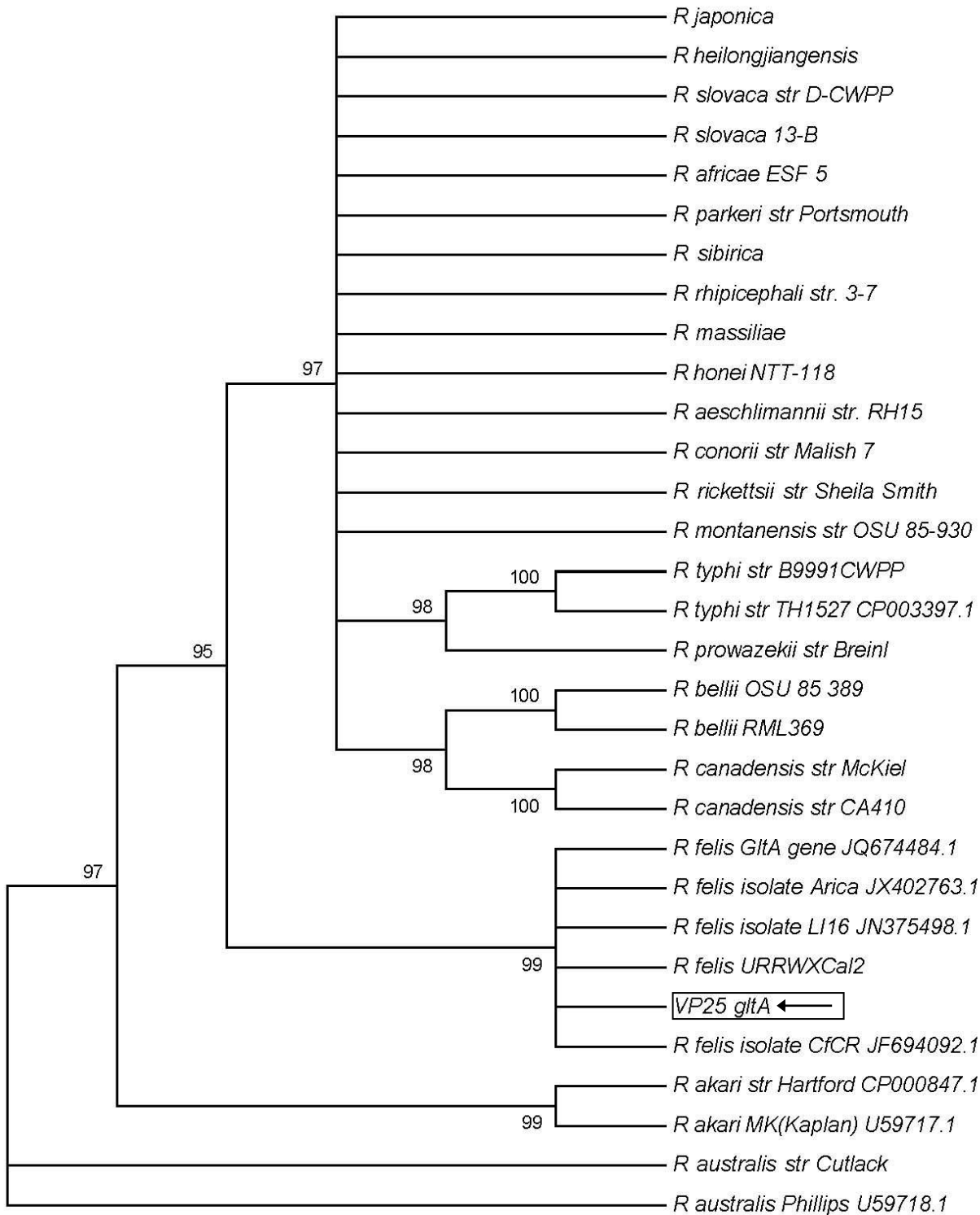


Figura 14. Árbol filogenético construido por el método de Maximum Parsimony basado en secuencias parciales del gen *gltA*, que evidencia la posición de la secuencia VP25 (flecha) entre especies del género *Rickettsia*. Se muestran los valores de bootstrap ($\geq 80\%$) para los grupos filogenéticos formados.

4. Capítulo 4. Conclusiones y Recomendaciones.

4.1. Conclusiones.

En el presente estudio se logró realizar la detección molecular de bacterias del género *Rickettsia* en garrapatas colectadas en un área endémica para las Rickettsiosis. Las especies fueron identificadas en muestras de garrapatas *D. nitens* colectadas en equinos provenientes de dos veredas del área rural del Municipio de Villeta. Después de los análisis de homología y de relación filogenética, pudo comprobarse que una de las secuencias obtenidas correspondió a una especie de *Rickettsia* del Grupo de las Fiebres Manchadas y la otra a *R. felis*.

Este trabajo detecta por primera vez, bacterias de este género en garrapatas colectadas durante los años posteriores a la presentación de los casos fatales en este Municipio, lo cual ha sido corroborado en estudios recientes en garrapatas obtenidas de hospederos (humanos y animales) y en pasturas de diferentes veredas.

En el presente estudio se detecta por primera vez genes de *Rickettsia* en garrapatas colectadas en el Municipio de La Peña (Cundinamarca). Aunque no lograron obtenerse secuencias de estas muestras, se puede inferir la posible circulación de estas bacterias en artrópodos colectados de animales domésticos.

A partir de lo revisado en la literatura científica, este es el primer reporte de detección de *R. felis* en garrapatas *D. nitens* colectadas de equinos; lo cual podría indicar posibles vías de transmisión horizontal a través de este artrópodo.

Los resultados aquí presentados y los recientes hallazgos de serorreactividad en hospederos animales y humanos, al igual que la detección molecular en garrapatas, confirman el comportamiento endémico de las Rickettsiosis en esta zona de Villeta y posiblemente en municipios aledaños de la Provincia del Gualivá. Esto sin duda es un argumento adicional para incluir y mantener a las Rickettsiosis como diagnóstico diferencial de cuadros febriles en humanos y animales de la región.

Aunque no se obtuvieron resultados positivos de amplificación y de secuenciación en las muestras provenientes de los departamentos de Córdoba y Antioquia (con excepción de una muestra de Turbo) no debe descartarse la circulación de estas bacterias en garrapatas de los municipios donde se confirmaron casos y muertes por *R. rickettsii*. Grupos de investigación en ambas regiones han logrado confirmar la presencia de especies del Grupo de las Fiebres Manchadas en ixódidos colectados recientemente en la región.

Aún deben resolverse algunos interrogantes alrededor de la historia natural de estas enfermedades en las zonas que pueden considerarse como endémicas en Colombia. Aunque los grupos de investigación involucrados con esta temática en el país, han avanzado en el conocimiento de aspectos relevantes relacionados con la ecoepidemiología de la enfermedad, deben precisarse aspectos como: las especies de *Rickettsia* involucradas en los casos clínicos humanos y aquellas que circulan en poblaciones de animales domésticos y silvestres y; la caracterización y diferenciación clínica de las Rickettsiosis (y otras entidades rickettsiales) que se presentan en estas zonas; la identificación y caracterización biológica y ecológica de los artrópodos involucrados en la transmisión y mantenimiento de estas bacterias; entre otros.

La inclusión de estas entidades en las agendas de Salud Pública nacionales permitiría el reporte de casos sospechosos y confirmados; la vigilancia activa y pasiva en poblaciones humanas a través de los laboratorios de Salud Pública departamentales y la vigilancia en animales domésticos a través de los servicios de Sanidad Animal. Lo anterior podría redundar en una mejor infraestructura y recursos para los procesos de atención, vigilancia e investigación básica y aplicada alrededor de estas patologías en Colombia.

4.2. Recomendaciones.

Sería recomendable que en futuros estudios de esta índole, se pueda incluir un número homogéneo y representativo de garrapatas para los procesos de detección molecular de *Rickettsias*. En el presente trabajo el número incluido en los análisis fue limitado para algunas de las regiones debido a que eran las existencias de la colección de artrópodos,

con diferencias significativas entre los especímenes colectados en Villeta por los estudios investigativos desarrollados en la región.

La detección molecular y el análisis de relación filogenética de especies de *Rickettsia* en artrópodos permite confirmar la circulación de las bacterias en éstos, no obstante, sería recomendable ampliar las investigaciones y llegar al aislamiento en cultivo celular para confirmar los resultados y caracterizar biológica y molecularmente a la(s) especie(s) involucrada(s). En el presente trabajo no pudo realizarse este proceso debido a que los especímenes se encontraban muertos y conservados en alcohol. En futuros trabajos que involucren posibles vectores deberán propender por mantener muestras vivas para el correcto aislamiento *in vitro*.

La detección de material genético de *Rickettsia* en un artrópodo no debe ser el único criterio a usar para poder incriminarlo como vector y/o reservorio del microorganismo. En estudios de incriminación vectorial deben incluirse ensayos que permitan corroborar otros postulados como la transmisión bajo condiciones experimentales a hospederos susceptibles, la dinámica poblacional del vector y su relación con el número de casos en humanos o animales, entre otros.

El hallazgo de artrópodos positivos en el Municipio de La Peña (Cundinamarca) genera interrogantes respecto a la situación actual de esta enfermedad en esta zona geográfica. Podrían realizarse estudios futuros en poblaciones humanas y animales para establecer la seroprevalencia para las Rickettsiosis y ampliar el número de garrapatas colectadas para realizar detección molecular, secuenciación y aislamiento.

Anexo A. Protocolo de preparación de muestras y extracción de DNA de garrapatas.

1. Condiciones previas:

1.1. Organizar los materiales, reactivos y equipos requeridos para la preparación y extracción:

- Pipetas automáticas de diferentes volúmenes (Se recomienda 0,1 a 2 μ L, de 2 a 20 μ L, de 20 a 200 μ L y de 100 a 1000 μ L).
- Puntas para las pipetas seleccionadas estériles en cajas (racks).
- Papel filtro
- Puntas automáticas azules con punta sellada.
- Cuchilla para escalpelo.
- Tubos eppendorf (microcentrífuga) de 1,5 ml.
- Guardián para descarte de puntas.
- Guantes de nitrilo y guantes de látex
- Marcador para tubos punta fina
- Gradilla
- Soluciones de trabajo del Estuche DNeasy Blood & Tissue [®] en tubos de 15 ml
- Etanol al 95%
- PBS 1X
- DNAzol[®]
- Centrífuga
- Vórtex
- Baño Serológico
- Cabina de flujo laminar

1.2. Organizar las muestras en el orden adecuado. Preparar la cabina de flujo laminar, realizar la limpieza respectiva con hipoclorito de sodio y etanol. Colocar todos los materiales necesarios para el procedimiento e irradiar con luz U.V. durante 15 minutos como mínimo.

2. Preparación de la muestra

- 2.1. Sacar las garrapatas del etanol (Sustancia en la que vienen almacenadas) y colocarlas sobre papel filtro en el baño serológico a 79°C durante 20 minutos.
- 2.2. Sacar las garrapatas del baño serológico y triturarlas sobre el papel filtro con la cuchilla de escalpelo.
- 2.3. Colocar las garrapatas en un tubo eppendorf, agregar 40 µL de PBS 1X y macerar con la punta sellada azul. Marcar la muestra y mantener en congelador a -20°C.

3. Procedimiento de extracción:

- 3.1. Nuevamente, organizar las muestras en el orden adecuado para la extracción. Preparar la cabina de flujo laminar, realizar la limpieza respectiva con hipoclorito de sodio y etanol. Colocar todos los materiales necesarios para el procedimiento e irradiar con luz U.V. durante 15 minutos como mínimo.
- 3.2. Retirar la cantidad de muestras seleccionada del congelador. Adicionar 400 µL de DNAzol® a cada muestra (previamente triturada y macerada).
- 3.3. Con una punta azul (1000 µL) sellada, realice un macerado corto y limpie las paredes del tubo que contiene la muestra.
- 3.4. Sedimentar el homogenizado centrifugando la muestra a 10.000 (g) x 10 minutos a 4 °C o a temperatura ambiente.
- 3.5. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2,0 mL (no suministrado por el estuche).
- 3.6. Agregar a la muestra 200 µL de Etanol al 100%.
- 3.7. Mezclar la muestra por inversión y vórtex. Mantener las muestras a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- 3.8. Transferir la mezcla a la columna ubicada en el tubo de 2,0 mL (suministrada en el estuche de DNeasy Blood & Tissue Kit®)
- 3.9. Centrifugar la muestra a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.

- 3.10. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2,0 mL (suministrado en el estuche) y descartar el tubo con el centrifugado.
- 3.11. Agregar 500 μ L de Buffer AW1 a cada columna.
- 3.12. Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- 3.13. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2,0 mL (suministrado en el estuche) y descartar el tubo con el centrifugado.
- 3.14. Agregar 500 μ L de Buffer AW2 a cada columna.
- 3.15. Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 6 minutos para garantizar el secado total de la columna.
- 3.16. Retirar la columna suavemente, evitando tenga contacto con el centrifugado, y transferirla a un nuevo tubo eppendorf de 2,0 mL (no suministrado en el estuche). Descartar el tubo con el centrifugado.
- 3.17. Agregar 55 μ L de Buffer AE a cada columna.
- 3.18. Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3.19. Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- 3.20. Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 2,0 mL (no suministrado en el estuche). NO DESCARTE EL CENTRIFUGADO, ES DNA EXTRAÍDO.
- 3.21. El centrifugado obtenido en la primera elución (paso 3.18.) deberá agregarlo a la misma columna.
- 3.22. Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 3.23. Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- 3.24. El centrifugado obtenido es el DNA extraído. Almacenarlo a -20 °C para posteriores estudios.

Anexo B. Protocolo para la amplificación del gen *16S rRNA* mitocondrial de garrapatas.

Condiciones de bioseguridad

El riesgo reside en la potencial contaminación de las muestras, más que en la contaminación del operador. Sin embargo, el procedimiento debe ser llevado a cabo en una cámara con flujo laminar que esté destinada exclusivamente para elaborar mezclas de reacción de PCR.

Materiales

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos de 1,5 ml
- Tubos de 200 μ l
- Agua para PCR
- Dideoxinucleótidos (dNTPs)
- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
- Buffer de PCR
- *Taq* polimerasa
- Iniciadores
- Hielo
- Alcohol
- Papel absorbente
- Guantes

Procedimientos

1. Calcule las cantidades de cada reactivo siguiendo la siguiente Tabla (esta tabla muestra las cantidades recomendadas para un volumen de reacción de 25 μ l). Calcule el volumen total según el número de muestras + uno:

Reactivo	Concentración Final	Volumen recomendado (μ l)	# de muestras + 1	Volumen total
Agua	-	18		
Buffer de reacción	1X	2,5		
MgCl ₂	2,0 mM	1		
Iniciador F	0,75 μ M	1		
Iniciador R	0,75 μ M	1		
dNTPs	200 μ M	0,25		
Taq	0,5 U/ μ l	0,25		
DNA		1		
TOTAL		25		

2. Programe el termociclador según el programa adecuado para cada reacción de PCR.
3. Limpie adecuadamente la cámara de flujo utilizando alcohol, y coloque el material necesario dentro de esta. Precaución: El DNA nunca debe ingresar a esta cámara. Deje irradiar con luz UV por un mínimo de 5 min. antes de empezar.
4. Coloque las cantidades requeridas de cada reactivo en un tubo de 1,5 ml. Recuerde mezclar bien cada reactivo antes de tomar la cantidad deseada, y mantener todos los reactivos en hielo.
5. Mezcle la solución de reacción por vórtex y coloque 24 μ l de ésta mezcla en cada tubo de 200 μ l debidamente rotulado. Recuerde mantener los tubos en hielo.
6. Retírese de la cámara y lleve los tubos al sitio designado para colocar el DNA.
7. Coloque 1 μ l de DNA en el tubo respectivo.
8. Coloque los tubos en el termociclador y encienda el programa adecuado.
9. No olvide limpiar nuevamente la cámara de flujo, botar los desechos, e irradiar con luz UV por 5 min. después de acabar el trabajo.
10. Una vez terminado el programa, retire los tubos del termociclador y almacénelos a -20°C hasta su procesamiento.

Condiciones:

Secuencia de los iniciadores			
16S+1 CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT			
16S-1 GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT			
Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Denaturación	94°C	3 minutos	1
Denaturación	94°C	30 segundos	10
Anillamiento	48°C	30 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Denaturación	94°C	30 segundos	15
Anillamiento	50°C	30 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Denaturación	94°C	30 segundos	10
Anillamiento	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Elongación	72°C	7 minutos	1
Tamaño amplicón: 460 pb			

Adaptado de:

- Hidalgo, M (2005). Manual de Protocolos en Rickettsiosis. Grupo Microbiología. Instituto Nacional de Salud.
- Mangold, A. J., Bargues, M. D., & Mas-Coma, S. (1998). "Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae)." Parasitol Res **84**(6): 478-484.

Anexo C. Amplificación por PCR convencional de genes de *Rickettsia*

Condiciones de bioseguridad

El riesgo reside en la potencial contaminación de las muestras, más que en la contaminación del operador. Sin embargo, el procedimiento debe ser llevado a cabo en una cámara con flujo laminar que esté destinada exclusivamente para elaborar mezclas de reacción de PCR.

Materiales

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos de 1,5 ml
- Tubos de 200 μ l
- Agua para PCR
- Dideoxynucleótidos (dNTPs)
- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
- Buffer de PCR
- *Taq* polimerasa
- Iniciadores
- Hielo
- Alcohol
- Papel absorbente
- Guantes

Procedimientos

1. Calcule las cantidades de cada reactivo siguiendo la siguiente tabla (esta tabla muestra las cantidades recomendadas para un volumen de reacción de 25 μ l). Calcule el volumen total según el número de muestras + uno:

Reactivo	Concentración Final	Volumen recomendado (µl)	# de muestras + 1	Volumen total
Agua	-	18		
Buffer de reacción	1X	2,5		
MgCl ₂	2,0 mM	1		
Iniciador F	0,75 µM	1		
Iniciador R	0,75 µM	1		
dNTPs	200 µM	0,25		
Taq	0,5 U/µl	0,25		
DNA		1		
TOTAL		25		

2. Programe el termociclador según el programa adecuado para cada reacción de PCR.
3. Limpie adecuadamente la cámara de flujo utilizando alcohol, y coloque el material necesario dentro de esta. Precaución: El DNA nunca debe ingresar a esta cámara. Deje irradiar con luz UV por un mínimo de 5 min. antes de empezar.
4. Coloque las cantidades requeridas de cada reactivo en un tubo de 1,5 ml. Recuerde mezclar bien cada reactivo antes de tomar la cantidad deseada, y mantener todos los reactivos en hielo.
5. Mezcle la solución de reacción por vórtex y coloque 24 µl de ésta mezcla en cada tubo de 200 µl debidamente rotulado. Recuerde mantener los tubos en hielo.
6. Retírese de la cámara y lleve los tubos al sitio designado para colocar el DNA.
7. Coloque 1µl de DNA en el tubo respectivo.
8. Coloque los tubos en el termociclador y encienda el programa adecuado.
9. No olvide limpiar nuevamente la cámara de flujo, botar los desechos, e irradiar con luz UV por 5 min. después de acabar el trabajo.
10. Una vez terminado el programa, retire los tubos del termociclador y almacénelos a -20°C hasta su procesamiento.

Secuencias de iniciadores y programas de termociclador

1. Gen *gltA*

Secuencia de los iniciadores			
CS-78 GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT			
CS-323 GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT			
Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Denaturación	95°C	3 minutos	1
Denaturación	95°C	15 segundos	40
Anillamiento	48°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Elongación	72°C	7 minutos	1
Tamaño amplicón: 401 pb			

2. Gen *ompB*

Secuencia de los iniciadores			
120.M59 CCGCAGGGTTGGTAACTGC			
120.807 CCTTTTAGATTACCGCCTAA			
Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Denaturación	95°C	3 minutos	1
Denaturación	95°C	30 segundos	40
Anillamiento	50°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Elongación	72°C	7 minutos	1
Tamaño amplicón: 862 pb			

3. Gen 17kD

Secuencia de los iniciadores			
17kD1 GCTCTTGCAACTTCTATGTT			
17kD2 CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG			
Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Denaturación	95°C	3 minutos	1
Denaturación	94°C	30 segundos	40
Anillamiento	57°C	2 minutos	
Extensión	70°C	2 minutos	
Elongación	72°C	7 minutos	1
Tamaño amplicón: 434 pb			

Adaptado de:

- Hidalgo, M (2005). Manual de Protocolos en Rickettsiosis. Grupo Microbiología. Instituto Nacional de Salud.

Anexo D. Secuencias consenso usadas en el análisis de relación filogenética

1. Muestra VP25

>VP25_gltA

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTTACTTATGAC
CCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGC
GACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGTGATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAAT
CTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTATAATAATTTCACTAACAGGTTGCTCATCATTATTAGT
GAATGAAAGATTACACTATTTATTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGG
CCGTTGGTTCTCTTTCGGCATTATTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

2. Muestra VP8

>VP8_17kD

TGCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAACAAGGTACAGGAA
CACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTT
GGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGAACA
GGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAG
AATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTG
GTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATACGGTAATG
CATGCCGCCAACCTGACGAACAATGA

Anexo E. Alineamiento múltiple de las secuencias para el gen *gltA* usando el algoritmo MUSCLE

>R_bellii_OSU_85_389

GCAAGTATTGGGCAGGATGTAATTGATATTAGTAAAGTATATTCTGAAGCGGATTGCTTT
 ACTTACGATCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCGTGTAGATCAACTATAACTTATATAGAT
 GGTGATCAAGGAATTTTGC GGCATCGTGGTTATGATATAAAAGATTTAGCCGAAAAAGC
 GACTTTTTAGAGGTGGCATATTTATTGATTTATGGGGAATTACCAAATAATAAGCAGTAT
 AATGATTTTACTAAAAAGGTTGCTCATCATGCGTTAGTTAATGAAAGATTACATTATTTA
 TTCAAACGTTTTGTAGCTCTTCGCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCGGTTGGTTCT
 CTTTCTGCATTTTATCCTGATTTGCTGAATTTT-----

>R_bellii_RML369

GCAAGTATTGGGCAGGATGTAATTGATATTAGTAAAGTATATTCTGAAGCGGATTGCTTT
 ACTTACGATCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCGTGTAGATCAACTATAACTTATATAGAT
 GGTGATCAAGGAATTTTGC GGCATCGTGGTTATGATATAAAAGATTTAGCCGAAAAAGC
 GACTTTTTAGAGGTGGCATATTTATTGATTTATGGGGAATTACCAAATAATAAGCAGTAT
 AATGATTTTACTAAAAAGGTTGCTCATCATGCGTTAGTTAATGAAAGATTACATTATTTA
 TTCAAACGTTTTGTAGCTCTTCGCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCGGTTGGTTCT
 CTTTCTGCATTTTATCCTGATTTGCTGAATTTT-----

>R_canadensis_str_McKiel

GCAAGTATAGGTGAGGATGTAATTGATATAAGTAGGGTCTCTTCGGAAGCTGATTGCTTT
 ACTTACGACCCTGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTAGATCTACAATAACCTACATAGAC
 GGTGATAAAGGAATCCTACGATATCGAGGATATGATATTAAGGATTTAGCCGAAAAAGT
 GATTTTTTTAGAGGTAGCATATTTATTGATTTACGGAGAATTACCAAGTAGTGAGCAGTAT
 AATAATTTTACTAAAAAGTCGCTGTTTCATTTCATTAGTGAATGAACGACTACATTATCTG
 TTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTGCGTTCT
 CTATCAGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_canadensis_str_CA410

GCCAGTATAGGTGAGGATGTAATTGATATAAGTAGGGTCTCTTCGGAAGCTGATTGTTTT
 ACTTATGACCCCGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTAGATCTACAATAACCTACATAGAT
 GGTGATAAAGGAATCCTACGATATCGAGGATATGATATTAAGGATTTAGCCGAAAAAGT
 GATTTTTTTAGAGGTAGCATATTTATTGATTTACGGAGAATTACCAAGTAGTGAGCAGTAT
 AATAATTTTACTAAAAAGTCGCTGTTTCATTTCATTAGTGAATGAACGACTACATTATCTG
 TTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTGCGTTCT
 CTATCAGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_prowazekii_str_Breinl

GCAAGTATCGGTAAAGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTACTTT
 ACTTATGATCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAATCTACTATCACATATATAGAC
 GGTGATAAAGGCATATTATGGTATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAAGT
 GATTTTTTTAGAAGTGGCATATTTGATGATTTATGGGGAGCTACCAAGTAGTGATCAGTAT

TGTAATTTTACTAAAAAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCAGCTGTTGGTTCT
CTTTCAGCATTCTATCCTGATTTATTAATTTTAATGAAACA

>R_typhi_str_B9991CWPP

GCAAGTATAGGTAAAGATGTAATAGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGATCCAGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAATCTACCATCACATATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTATGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGATGATTTATGGGGAACCTACCAAGTAGTGAGCAGTAT
CATAATTTTACTACAAAGATTGCTCATCATGCATTAGTAAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCAGCTGTTGGTTCT
CTTTCAGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAATGAA---

>R_typhi_str_TH1527_CP003397.1

GCAAGTATAGGTAAAGATGTAATAGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGATCCAGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAATCTACCATCACATATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTATGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGATGATTTATGGGGAACCTACCAAGTAGTGAGCAGTAT
CATAATTTTACTACAAAGATTGCTCATCATGCATTAGTAAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCAGCTGTTGGTTCT
CTTTCAGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAATGAAACA

>R_rickettsii_str_Sheila Smith

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAGACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCAGCTGTCGGTTCT
CTTGCAGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_japonica

GCAAGTATTGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTGTTACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGTGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCAGCTGTCGGTTCT
CTTTCAGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_honei_NTT-118

GCAAGTGTGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTATGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT

AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_africae_ESF_5

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTATGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAT
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGTGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_rhipicephali_str._3-7

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCGCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGCAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_montanensis_str_OSU 85-930

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTTGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_slovaca_str_D-CWPP

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGTGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_slovaca_13-B

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGTGAGCAGTAT

AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_heilongjiangensis

GCAAGTATTGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGTGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_aeschlimannii_str._RH15

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAATGGCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_massiliae

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCGCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_parkeri_str_Portsmouth

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAT
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

>R_sibirica

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGAT
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGTAT

AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
 TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
 CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCA

>R_conorii_str_Malish_7

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTT
 ACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACCTATATAGAC
 GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGT
 GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGAACTACCAAGTGGCGAGCAGTAT
 AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
 TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCT
 CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCA

>R_felis_isolate_LI16_JN375498.1

-----CGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT
 ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
 GGTGATAAAGGAATCTTGCGACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGT
 GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTAT
 AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
 TTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
 CTTTCGGCATTATCCTGATTTACTGAATTTAAAGAAGCA

>R_felis_gltA_gene_JQ674484.1

GCAAGTATTGGTGAGGATGTAATCGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT
 ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
 GGTGATAAAGGAATCTTGCGACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGT
 GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTAT
 AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
 TTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
 CTTTCGGCATTATCCTGATTTACTGAATTTAAAGAAGCA

>R_felis_URRWXCal2

GCAAGTATTGGTGAGGATGTAATCGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT
 ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
 GGTGATAAAGGAATCTTGCGACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGT
 GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTAT
 AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
 TTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
 CTTTCGGCATTATCCTGATTTACTGAATTTAAAGAAGCA

>VP25_gltA

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT
 ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
 GGTGATAAAGGAATCTTGCGACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGT
 GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTAT

AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCA

>R_felis_isolate_Arica_JX402763.1

-----GAGGATGTAATCGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT
ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
CTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGA-----

>R_felis_isolate_CfCR_JF694092.1

-----CGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT
ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCACATCGAGGATATGACATTAAGATTTAGCCGAGAAAAGT
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGGAGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACATTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
CTTTCGGCATTAT-----

>R_akari_str_Hartford_CP000847.1

GCAAGTATAGGTGAGGATGTAATCGACATAAGCAGGGTATCTGCGGAAGTCAATTGTTTT
ACTTATGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTAAAGTCTACTATCACTTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATAATATTAAGATTTAGCCGAGAAGAGC
GATTTTTTGAAGTGGCATATTTGCTAATCTATGGAGAATTACCAAGCATCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTATTGGTTCT
CTGTCCGCATTTATCCTGATTTACTGAATTTAAAGAAGCA

>R_akari_MK(Kaplan)_U59717.1

GCAAGTATAGGTGAGGATGTAATCGACATAAGCAGGGTATCTGCGGAAGTCAATTGTTTT
ACTTATGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTAAAGTCTACTATCACTTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATAATATTAAGATTTAGCCGAGAAGAGC
GATTTTTTGAAGTGGCATATTTGCTAATCTATGGAGAATTACCAAGCATCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTATTGGTTCT
CTGTCCGCATTTATCCTGATTTACTGAATTTAAAGAAGCA

>R_australis_str_Cutlack

GCAAGTATAGGTGAGGATGTAATCGACATAAGCAGGGTATCTGCGGAGGCCGATTGTTTT
ACTTATGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATAATATTAAGATTTAGCCGAGAAGAGC
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTATGGAGAATTACCAAGCATCGAGCAGTAT

AATAATTTCACTACACAGGTTGCTCATCATTATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAGCCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
CTGTCGGCATTTTACCCTGATTTACTGAATTTTAAAGAAGCA

>R_australis_Phillips_U59718.1

GCAAGTATAGGTGAGGATGTAATCGACATAAGCAGGGTATCTGCGGAGGCCGATTGTTTT
ACTTATGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTGTCAGTCTACTATCACTTATATAGAC
GGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATAATATTAAGATTTAGCCGAGAAGAGC
GATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTATGGAGAATTACCAACTATCGAGCAGTAT
AATAATTTCACTACACAGGTTGCTCATCATTATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTA
TTTCAAGCCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCT
CTGTCGGCATTTTACCCTGATTTACTGAATTTTAAAGAAGCA

Anexo F. Alineamiento múltiple de las secuencias para el gen *17kD* usando el algoritmo MUSCLE

>VP8_17kD

TGCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGCGGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAAAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGAACAATGA

>R_bellii_OSU_85389

---CTTGCAGCTTCAATGTTGCAAGCATGCCAAGGTCCGGGCGGCATGAATAAGCAAGG
TAGTGGTACGCTAATCGGTGGAACAGCTGGTGCATTACTAGTTCTCAATTTGGTGGTGG
TACAGGGCGTCTTGCTGCGGTAGGAGCAGGTGCATTACTTGGTGCAATCCTTGGTAACCA
AATTGGTGCAGGTATGGATGAACAAGATAGAAACTTGCAGAGCTTACCTCCCAAAGAGC
TTTAGAAGCTGCACCAAGTGGTAGCAGTGTACAATGGCGTAATCCTGATAATGGTAATTA
TGGTACTGTAACACCAAGCAAAGCTTATAAAAAACAATACCGGTCAATATTGCCGTGAATA
TACCCAAACAGTTGTAGTAGGTGAAAACAACAAAAAGCTTATGGCACTGCCTGCCGTCA
ACCTGATGGACAATG-

>R_bellii_RML369-C

---CTTGCAGCTTCAATGTTGCAAGCATGCCAAGGTCCGGGCGGCATGAATAAGCAAGG
TAGTGGTACGCTAATCGGTGGAACAGCAGGTGCATTACTAGTTCTCAATTTGGTGGTGG
TACAGGGCGTCTTGCTGCGGTAGGAGCAGGTGCATTACTTGGTGCAATCCTTGGTAACCA
AATTGGTGCAGGTATGGATGAACAAGATAGAAACTTGCAGAGCTTACCTCCCAAAGAGC
TTTAGAAGCTGCACCAAGTGGTAGCAGTGTACAATGGCGTAATCCTGATAATGGTAATTA
TGGTACTGTAACACCAAGCAAAGCTTATAAAAAACAATACCGGTCAATATTGCCGTGAATA
TACCCAAACAGTTGTAGTAGGTGAAAACAACAAAAAGCTTATGGCACTGCCTGCCGTCA
ACCTGATGGACAATG-

>R_canadensis_str_CA410

-GCTCTTGTAGCTTTTATGTTACAAGCATGTACCGTTTCAGGCGGTATGAATAAGCAAGG
TAGCGGTACGCTAATTGGCGGTACGGCAGGTGCGTTACTGGGTTCTCAGTTCCGGTAAGGG
TAAAGGACAGCTTATTGGAGTAGGTGCTGGAGCATTACTAGGTGCTATCCTTGGTAATCA
AATTGGTGCAGGCATGGACGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAACTCACCTCGCAAAGAGC
GTTAGAAACAACACCTAGCGGTACTAGCATAGAATGGCGTAATCCAGATAACGGTAATTA
CGGTTATGTAACACCTAGCAAACTTATAAAAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGTGAAAACAGCAAAAAGCATAACGGTAATGCATGTGCCCA
ACCTGATGGACAATG-

>R_canadensis_str_McKiel

-GCTCTTGTAGCTTTTATGTTACAAGCATGTACCGGTTTCAGGCGGTATGAATAAGCAAGG
TAGCGGTACGCTAATTGGCGGTACGGCAGGTGCGTTACTGGGTTCCCAGTTCGGTAAGGG
TAAAGGACAGCTTATTGGAGTAGGTGCTGGAGCATTACTAGGTGCTATCCTTGGTAATCA
AATTGGTGCAGGCATGGACGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAACTCACCTCGCAAAGAGC
GTTAGAAACAACACCTAGCGGTACTAGCATAGAATGGCGTAATCCAGATAACGGTAATTA
CGGTTATGTAACACCTAGCAAAACTTATAAAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGTGGAAAACAGCAAAAAGCATACGGTAATGCATGTCGCCA
ACCTGATGGACAATG-

>R_typhi_str_B9991CWPP

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCATGTAATGGTCCGGGTGGTATGAACAAACAAGG
GACTGGAACACTTCTTGGTGGCGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCACGG
TAAAGGACAACCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAAGTATGGATGAGCAGGATAGAAAACCTTCTAGAACTAACATCACAAAGAGC
TTTAGAATCTGCTCCTAGCGGTAGTAACATAGAATGGCGCAATCCAGATAATGGCAATCA
TGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGGAACAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAATA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGGGGAAAACAACAACAACATATGGAAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGGCAATG-

>R_typhi_str_TH1527

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCATGTAATGGTCCGGGTGGTATGAACAAACAAGG
GACTGGAACACTTCTTGGTGGCGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCACGG
TAAAGGACAACCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAAGTATGGATGAGCAGGATAGAAAACCTTCTAGAACTAACATCACAAAGAGC
TTTAGAATCTGCTCCTAGCGGTAGTAACATAGAATGGCGCAATCCAGATAATGGCAATCA
TGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGGAACAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAATA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGGGGAAAACAACAACAACATATGGAAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGGCAATG-

>R_typhi_str_Wilmington

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCATGTAATGGTCCGGGTGGTATGAACAAACAAGG
GACTGGAACACTTCTTGGTGGCGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCACGG
TAAAGGACAACCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAAGTATGGATGAGCAGGATAGAAAACCTTCTAGAACTAACATCACAAAGAGC
TTTAGAATCTGCTCCTAGCGGTAGTAACATAGAATGGCGCAATCCAGATAATGGCAATCA
TGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGGAACAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAATA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGGGGAAAACAACAACAACATATGGAAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGGCAATG-

>R_prowazekii_str_Breinl

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCTTGTAAATGGTCAGAGTGGTATGAACAAACAAGG
TACCGGTACACTTCTTGGTGGCGCAGGAGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCAAGG
TAAAGGACAACCTTGTCCGAGTAGGTGTAGGCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGGTGGACA

AATCGGCGCAAGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTCTAGAACTAACATCACAAAGAGC
 TTTAGAATCTGCACCTAGCGGTAGTAACATAGAATGGCGCAATCCAGATAACGGCAATCA
 TGGTTACGTACACCTAATAAACTTATAGGAACAGTGCAGGTCAATATTGCCGTGAATA
 CACTCAAACAGTTATAATAGGCGGAAAACAACAAAAACATATGGTAATGCATGCCGTCA
 ACCTGATGGGCAATG-

>R_felis_URRWXCal2

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGACCAGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACGGGAACACTTCTTGGCGGTGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGCAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTTCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTT-GAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATAGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCTGAACTCACTTCACAAAGAGC
 TTTAGAAGCAACACCTAGCGGCACTAGCGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGTAATCA
 TGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACTATG-

>Candidatus_R_amblyommii_str_GAT_30V

-GCTCTTGCAGCTTCTACGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTTCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AGTCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGAATTGCAGAGCTTACCTCACAGAAAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAACGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 TGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_rhipicephali_str_3-7

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGAGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTTCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGCGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACATAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACCGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_massiliae_MTU5

-GCTCTTGCAGCTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGAGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTTCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATAGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTGCCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGCGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACATAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACCGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA

ACCTGACGGACAATG-

>R_montanensis_str_OSU_85-930

-GCTCTTGCACTTCTATGTTACAAGCCTGCAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGCACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGCGGTAGTAACTGATAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_africae_ESF5

-GCTCTTGCACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAAAAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACTGATAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAATA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_honei_strain_RB

-----CAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACTGATAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGAACAA---

>R_slovaca_str_D_CWPP

-GCTCTTGCACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTACAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACTGATAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_slovaca_13B

-GCTCTTGCACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG

CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTACAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_sibirica

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCAGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_peacockii_str_Rustic

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGTCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_conorii_str_Malish_7

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGCATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_philipii_str_364D

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA

CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_parkeri_str_Portsmouth

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Arizona

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Brazil

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Colombia

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Hauke

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG

TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Hino

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Hlp2

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Iowa

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
 CGGTTACGTAACACCTAATAAAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
 CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
 ACCTGACGGACAATG-

>R_rickettsii_str_Sheila Smith

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
 TACAGGAACACTTCTTGGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
 CAAAGGACAGCTTGTGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
 AATCGGTGCAGGTATGGATGAACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
 TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA

CGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_japonica_YH

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGTGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CACAGGACAGCTTGTGGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_heilongjiangensis_054

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
CACAGGAAAGCTTGTGGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACA
AATCGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGTGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAGAACTTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_australis_str_Cutlack

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACAGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
-ACAGGAACACTTCTTGCGGTGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAGTTCGGTAAGGG
CAAAGGACAGCTTGTGCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTGCTTGGTGGACA
AATAGGTGCAGGTATGGATGAGCAAGATAGAAGACTTGCAGAGCTCACCTCACAAAGAGC
TTTAGAAACAGCTCCTAGCGGTAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTA
TGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGAAATAGCAATGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAACGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

>R_akari_str_Hartford

-GCTCTTGCAACTTCTATGTTACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGG
TACAGGAACACTTCTTGCGGTGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGG
AAAAGGAAATCTTGTGCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTGCTTGGTGGACA
AATAGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTCACCTCTCAAAGAGC
TTTAGAATCAGCTCCTAGCGGTAGTAACGTAGAGTGGCGTAATACGGATAACGGCAATTA
CGGTTACGTAACACCTAATAAAAACCTTATAGAAATAGCAATGGTCAATATTGCCGTGAGTA
CACTCAAACAGTTGTAATAGGCGGAAAACAACAAAAAGCATAACGGTAATGCATGCCGCCA
ACCTGACGGACAATG-

Bibliografía

1. Fournier P, Raoult D. Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of *Rickettsia*. In: Raoult D, Parola P, editors. Rickettsial Diseases. New York: Informa Health Care; 2005. p. 1-14.
2. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;10(4):694-719.
3. Ngwamidiba M, Raoult D, Fournier PE. Les Rickettsies-historique et actualité (1er partie). Antibiotiques. 2006;8:117-31.
4. Gross D, Schafer G. 100th anniversary of the death of Ricketts: Howard Taylor Ricketts (1871-1910). The namesake of the Rickettsiaceae family. Microbes Infect. 2011 Jan;13(1):10-3.
5. Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infect Dis. 2007 Nov;7(11):724-32.
6. Renvoise A, Raoult D. L'actualité des rickettsioses. Med Mal Infect. 2009 Feb;39(2):71-81.
7. Ngwamidiba M, Raoult D, Fournier P. Les Rickettsies : caractères microbiologiques, identification, relations avec les arthropodes, pathogénie des infections (2e partie). Antibiotiques. 2006;8:117-31.
8. Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. Ann N Y Acad Sci. 2009 May;1166:1-11.
9. Eremeeva ME. Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. Ticks Tick Borne Dis. 2012 Dec;3(5-6):332-7.
10. Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, & Labruna MB. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of Sao Paulo, Brazil. Parasitology. 2012 Sep;139(10):1283-300.
11. Stothard DR, Clark JB, Fuerst PA. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. Int J Syst Bacteriol. 1994 Oct;44(4):798-804.

12. Stothard DR, Fuerst PA. Evolutionary Analysis of the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* Using 16S rRNA Gene Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*. 1995;18(1):52-61.
13. Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, Sobral BS, & Azad AF. Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One*. 2007;2(3):e266.
14. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol*. 1997 Apr;47(2):252-61.
15. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol*. 1998 Jul;48 Pt 3:839-49.
16. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000 Jul;50 Pt 4:1449-55.
17. Bitam I. Vectors of rickettsiae in Africa. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012 Dec;3(5-6):382-6.
18. Fournier PE, Raoult D. Identification of rickettsial isolates at the species level using multi-spacer typing. *BMC Microbiol*. 2007;7:72.
19. The Taxonomicon. Zwaag: Universal Taxonomic Services; [cited 2013 26-marzo]; Available from: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/>.
20. NCBI. Taxonomy Browser. [cited 2013 26-marzo]; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy.
21. Fournier PE, Zhu Y, Yu X, Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia sibirica* and an emended description of *Rickettsia sibirica*. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1078:597-606.
22. Zhu Y, Fournier PE, Ereemeeva M, Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol*. 2005;5:11.

23. Wenjun LI, Mouffok N, Rovey C, Parola P, Raoult D. Genotyping *Rickettsia conorii* detected in patients with Mediterranean spotted fever in Algeria using multispacer typing (MST). Clin Microbiol Infect. 2009 Dec;15 Suppl 2:281-3.
24. Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Ann N Y Acad Sci. 2009 May;1166:156-66.
25. Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. Ticks Tick Borne Dis. 2012 Dec;3(5-6):271-8.
26. Guglielmone AA, Bechara GH, Szabó MP, Barros DM, Faccini JL, Labruna M, De La Vega R, Arzua M, Campos M, Furlong J, Mangold AJ, Martins J, Rodríguez M, Venzal JM, Estrada A. Garrapatas de importancia médica y veterinaria: América Latina y El Caribe. The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick – borne Diseases (ICTTD – 2).2004. 44 p.
27. Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Keirans JE, Robbins RG. Ticks (Acari: Ixodidae) of the neotropical zoogeographic region. The Netherlands: International Consortium on Ticks and Tick – borne Diseases (ICTTD – 2).2003. 173 p.
28. Bowman D. Arthropods. In: Bowman D, Lynn R, Eberhard M, Alcaraz A, editors. Georgi's Parasitology for Veterinarians. Eight ed. St. Louis: Saunders; 2003. p. 48-59.
29. Wall R, Shearer D. Ticks (Acari). Chapter 3. In: Veterinary Ectoparasites: biology, pathology, and control. Second ed. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2001. p. 55-82.
30. Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. Exp Appl Acarol. 2002;28(1-4):27-54.
31. Cortés-Vecino JA. Bioecología, Distribución y Comportamiento de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae) en el Altiplano Cundiboyacense, Colombia. [Ph.D. Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.341 p.
32. Sonenshine D, Robert L, Nicholson WL. Ticks (Ixodida). In: Mullen G, Durden LA, editors. Medical and Veterinary Entomology: Academic Press; 2002. p. 517-58.

33. Núñez J, Cobeñas M, Moltedo H. *Boophilus microplus*: the common cattle tick. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 1982. 204 p.
34. Marcondes C. Entomología Médica y Veterinaria. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. 432 p.
35. Parra H, Pelaez I, Segura J, Londoño J, Díaz E, Vanegas M. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. In: CORPOICA, editor. Ibagué 1999. p. 80.
36. Evans DE. *Boophilus microplus* ecological studies and tick fauna synopsis related to the developing cattle industry in the Latin American and Caribbean region [Ph.D. Tesis]. North East London Polytechnic.; United Kingdom. 1978. 283 p.
37. Evans DE. Points arising from present data on tick distribution in Latin America. Workshop on the Ecology and Control of External Parasites of Economic Importance on Bovines in Latin America; Cali. 1975. p. 29-35.
38. Liebisch A. Informe de consultoría presentado al proyecto Colombo – Aleman: “Intensificación del Control de las Enfermedades Animales en Colombia” sobre taxonomía, ecología y control de las garrapatas. GTZ. Bogotá. 1984. 85 p.
39. Klompen JSH, Black WC, Keirans JE, Norris DE. Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. Cladistics. 2000;16(1):79-102.
40. Hugh-Jones M, Barre N, Nelson G, Wehnes K, Warner J, Garvin J, & Garris G. Landsat-TM identification of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) Habitats in Guadeloupe. Remote Sensing of Environment. 1992;40(1):43-55.
41. Hugh-Jones M. The remote recognition of ticks habitats. Journal of Agriculture Entomology. 1991;8(4):309-15.
42. Osorno E. Las garrapatas de la República de Colombia. Anuario de Medicina. 1939;27:398-429.
43. Cortés-Vecino JA, Betancourt JA, Argüelles J, Pulido LA. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2010;11(1):73-84.

44. López G. Identificación y distribución de garrapatas de bovinos en Colombia. Seminario Internacional sobre: diagnóstico, epidemiología y control de enfermedades parasitarias; Palmira 1990. p. 28-49.
45. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 2012 Oct;28(10):437-46.
46. Jongejans F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004;129 Suppl:S3-14.
47. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol.* 2011 Nov 24;182(1):14-21.
48. Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis.* 1998 Apr-Jun;4(2):179-86.
49. Telford SR, 3rd, Parola P. Arthropods and Rickettsiae. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Diseases.* New York: Informa Health Care; 2005. p. 27-36.
50. Reisen W. Epidemiology of Vector-Borne Diseases. In: Mullen G, Durden LA, editors. *Medical and Veterinary Entomology: Academic Press;* 2002. p. 15-27.
51. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res.* 2005. May-Jun;36(3):469-92.
52. Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology.* 2010;26(4):205-12.
53. Minjauw B, McLeod A. Tick-borne diseases and poverty: the impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihoods of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. Edinburgh: DFID Animal Health Programme, Centre for Tropical Veterinary Medicine; 2003. 124 p.
54. Parola P, Paddock C, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):719-56.
55. Philip CB. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. *Public Health Rep.* 1959 Jul;74(7):595-600.

56. Kelly PJ, Mason PR. Transmission of a spotted fever group rickettsia by *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 1991 Sep;28(5):598-600.
57. Horta MC, Pinter A, Schumaker TT, Labruna MB. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:285-90.
58. Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. Acta Trop. 1979 Dec;36(4):357-67.
59. Matsumoto K, Ogawa M, Brouqui P, Raoult D, Parola P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. Med Vet Entomol. 2005 Sep;19(3):263-70.
60. Goddard J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. J Med Entomol. 2003 Sep;40(5):686-9.
61. Dumler J, Walker D. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. N Engl J Med. 2005 Aug;353(6):551-3.
62. Piranda E, Faccini J, Pinter A, Pacheco R, Cançado P, Labruna M. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsii*, Using Experimentally Infected Dogs. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011, 11(1): 29-36.
63. Rehacek J. *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology. Praha: Academia; 1984.
64. Matsumoto K, Ogawa M, Brouqui P, Raoult D, Parola P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. Medical and Veterinary Entomology. 2005;19(3):263-70.
65. Zemtsova G, Killmaster L, Mumcuoglu K, Levin M. Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Experimental and Applied Acarology. 2010;52(4):383-92.

66. Burgdorfer W, Hayes SF, Mavros AJ. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer W, Anacker RL, editors. Rickettsiae and rickettsial diseases. New York: Academic Press; 1981. p. 585-94.
67. Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. J Med Entomol. 2002 Nov;39(6):809-13.
68. Spencer RB. Rocky Mountain Spotted Fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. Public Health Rep. 1923 February 23,1923;38(8):333-9.
69. Nieblyski M, Peacock M, Schwan T. Lethal Effect of *Rickettsia rickettsii* on Its Tick Vector (*Dermacentor andersoni*). Applied and Environmental Microbiology. 1999 February,1999;65(2):773-8.
70. Rovey C, Renesto P, Crapoulet N, Matsumoto K, Parola P, Ogata H, & Raoult D. Transcriptional response of *Rickettsia conorii* exposed to temperature variation and stress starvation. Res Microbiol. 2005 Mar;156(2):211-8.
71. Hayes SF, Burgdorfer W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. Infect Immun. 1982 Aug;37(2):779-85.
72. Childs J, Paddock CD. Rocky Mountain Spotted Fever. In: Raoult D, Parola P, editors. Rickettsial Diseases. New York: Informa Health Care; 2005. p. 97-116.
73. Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infect Dis. 2007 Nov;7(11):724-32.
74. Labruna MB, Mattar S, Nava S, Bermudez CS, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, De Sousa R, Oteo JA, Zavala-Castro JE. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. RevMVZ Córdoba. 2011;16(2):2435-57.
75. Chapman AS, Bakken JS, Folk SM, Paddock CD, Bloch KC, Krusell A, Sexton DJ, Buckingham SC, Marshall GS, Storch GA, Dasch GA, McQuiston JH, Swerdlow DL, Dumler SJ, Nicholson WL, Walker DH, Eremeeva ME, Ohl CA. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis-United States: a practical guide for

physicians and other health-care and public health professionals. MMWR Recomm Rep. 2006 Mar 31;55(RR-4):1-27.

76. Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Annals of the New York Academy of Sciences. 2009;1166(1):156-66.

77. Moore JJ. Time Relationships of the Wood-Tick in the Transmission of Rocky Mountain Spotted Fever. The Journal of Infectious Diseases. 1911;8(3):339-47.

78. Thorner AR, Walker DH, Petri WA, Jr. Rocky Mountain Spotted Fever. Clin Infect Dis. 1998 Dec;27(6):1353-9.

79. Wells GM, Woodward TE, Fiset P, Hornick RB. Rocky mountain spotted fever caused by blood transfusion. JAMA. 1978 Jun 30;239(26):2763-5.

80. Oster CN, Burke DS, Kenyon RH, Ascher MS, Harber P, Pedersen CE, Jr. Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. N Engl J Med. 1977 Oct 20;297(16):859-63.

81. Johnson JE, 3rd, Kadull PJ. Rocky Mountain spotted fever acquired in a laboratory. N Engl J Med. 1967 Oct 19;277(16):842-7.

82. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Maggi RG, Lantos PM, Aslett DM, Bradley JM. *Rickettsia rickettsii* transmission by a lone star tick, North Carolina. Emerg Infect Dis. 2011 May;17(5):873-5.

83. Davis G. Experimental transmission of the spotted fevers of the United States, Colombia, and Brazil by the argasid tick *Ornithodoros parkeri*. Public Health Rep. 1943 August 6,1943;58(32):1201-8.

84. Parker RR, Bell JF, Chalgren WS, Thraillkill FB, McKee MT. The recovery of strains of Rocky Mountain spotted fever and tularemia from ticks of the eastern United States. J Infect Dis. 1952;91(3):231-7.

85. Parker R, Kohls GM, Steinhaus EA. Rocky Mountain spotted fever: spontaneous infection in the tick *Amblyomma americanum*. Public Health Rep. 1943;58:721-9.

86. Bustamante M, Varela IV G. Studies on spotted fever in Mexico: the role of *Rhipicephalus sanguineus* in the transmission of spotted fever in the Mexican Republic. *Rev Inst Salubr Enferm Trop*. 1947;8:139-41.
87. Eremeeva ME, Zambrano ML, Anaya L, Beati L, Karpathy SE, Santos-Silva MM, Salceda B, MacBeth D, Olguin H, Dasch GA, Aranda CA. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *J Med Entomol*. 2011 Mar;48(2):418-21.
88. Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin ML, Singleton J Jr, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, McQuiston JH. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Engl J Med*. 2005 Aug 11;353(6):587-94.
89. Piranda EM, Faccini JL, Pinter A, Pacheco RC, Cancado PH, Labruna MB. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsii*, Using Experimentally Infected Dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 Jan;11(1):29-36.
90. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, Labruna MB. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med Vet Entomol*. 2011 Jun;25(2):148-55.
91. Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol*. 2008 Apr 15;152(3-4):173-85.
92. Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandao-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Jan-Feb;39(1):64-7.
93. Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ. The distribution and ecological 'preferences' of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Ann Trop Med Parasitol*. 2004 Apr;98(3):283-92.
94. Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MP, Martins JR, Gonzalez-Acuna D, Estrada-Peña A.

- Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol.* 2006;40(2):83-100.
95. Guedes E, Leite RC, Prata MC, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Dec;100(8):841-5.
96. Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondogui CE. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Apr;78(4):687-92.
97. Dias E, Martins AV. Spotted Fever in Brazil. A Summary. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1939;19:103-8.
98. Bustamante M, Varela G. Estudios de fiebre manchada en México: Hallazgo del *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado en Veracruz. *Rev Inst Salub Enfs Trop.* 1946;7:75-8.
99. De Rodaniche EC. Natural infection of the tick, *Amblyomma cajennense*, with *Rickettsia rickettsii* in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1953 Jul;2(4):696-9.
100. Pinter A, Dias RA, Gennari SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2004 May;41(3):324-32.
101. Labruna MB. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerging Infectious Diseases.* 2011.
102. Burgdorfer W. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1970 Nov;19(6):1010-4.
103. Burgdorfer W, Brinton LP. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;266:61-72.
104. McDade JE, Newhouse VF. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:287-309.
105. Burgdorfer W, Friedhoff KT, Lancaster JL, Jr. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. *Bull World Health Organ.* 1966;35(2):149-53.

106. Childs J, Paddock CD. Passive Surveillance as an Instrument to Identify Risk Factors for Fatal Rocky Mountain Spotted Fever: Is There More to Learn? *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(5):450-7.
107. Openshaw JJ, Swerdlow DL, Krebs JW, Holman RC, Mandel E, Harvey A, Haberling D, Massung RF, McQuiston JH. Rocky mountain spotted fever in the United States, 2000-2007: interpreting contemporary increases in incidence. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Jul;83(1):174-82.
108. Pinter A, França A, de Souza CE, Sabbo C, Do Nascimento EM, Dos Santos FC, Labruna M, Holcman M, Chinelatto MJ, Horta MC, Mascheretti M, Mayo RM, Angerami RN, Brasil RA, De Souza SS, Colombo S, Oliveira VL. Febre Maculosa Brasileira. *Boletim Epidemiologico Paulista.* 2011;Sup. 8(1):1-31.
109. Paddock CD, Holman RC, Krebs JW, Childs JE. Assessing the magnitude of fatal Rocky Mountain spotted fever in the United States: comparison of two national data sources. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Oct;67(4):349-54.
110. Walker D. *Rickettsia rickettsii*: As Virulent as Ever. *Am J Trop Med Hyg.* [Editorial]. 2002;66(5):448-9.
111. Silber JL. Rocky Mountain spotted fever. *Clin Dermatol.* 1996 May-Jun;14(3):245-58.
112. Helmick CG, Bernard KW, D'Angelo LJ. Rocky Mountain spotted fever: clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. *J Infect Dis.* 1984 Oct;150(4):480-8.
113. Sexton DJ, Kaye KS. Rocky mountain spotted fever. *Med Clin North Am.* 2002 Mar;86(2):351-60.
114. Kelly PJ. Rickettsial Diseases of Domestic Animals. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Diseases.* New York: Informa Health Care; 2005. p. 331-43.
115. Milagres BS, Padilha AF, Barcelos RM, Gomes GG, Montandon CE, Pena DC, Nieri Bastos FA, Silveira I, Pacheco R, Labruna MB, Bouyer DH, Freitas RN, Walker DH, Mafra CL, Galvao MA. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever

in the eastern region of Minas Gerais, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Dec;83(6):1305-7.

116. Ober CP, Spaulding K, Breitschwerdt EB, Malarkey DE, Hegarty BC. Orchitis in two dogs with Rocky Mountain spotted fever. *Vet Radiol Ultrasound.* 2004 Sep-Oct;45(5):458-65.

117. Mikszewski JS, Vite CH. Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2005 Jul-Aug;41(4):259-66.

118. Labruna M, Kamakura O, Moraes-Filho J, Horta MC, Pacheco R. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):458-60.

119. Paddock CD, Brenner O, Vaid C, Boid D, Berg J, Joseph R, Zaki S, Childs J. Concurrent Rocky Mountain Spotted Fever in a Dog and its Owner *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2):197-9.

120. Paddock CD, Sumner JW, Comer J, Zaki S, Goldsmith C, Goddard J, McLellan S, Tamminga CL, Ohl CA. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever in the United States. *Clin Infect Dis.* 2004;38(6):805-11.

121. Romer Y, Seijo AC, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Lash RR, Paddock, CD. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jul;17(7):1169-73.

122. Pacheco RC, Venzal JM, Richtzenhain LJ, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. *Emerg Infect Dis.* 2006 Nov;12(11):1804-5.

123. Cohen SB, Yabsley MJ, Garrison LE, Freye JD, Dunlap BG, Dunn JR, Mead DG, Jones TF, Moncayo AC. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma americanum* ticks, Tennessee and Georgia, USA. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1471-3.

124. Varela-Stokes AS, Paddock CD, Engber B, Toliver M. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma maculatum* ticks, North Carolina, USA, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2011 Dec;17(12):2350-3.

125. Venzal JM, Estrada-Peña A, Portillo A, Mangold AJ, Castro O, De Souza CG, Felix ML, Perez-Martinez L, Santibanez S, Oteo JA. *Rickettsia parkeri*: a Rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever

rickettsiosis in southern Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012 May-Jun;54(3):131-4.

126. Tomassone L, Conte V, Parrilla G, De Meneghi D. *Rickettsia* infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010 Dec;10(10):953-8.

127. Ogrzewalska M, Martins T, Capek M, Literak I, Labruna MB. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013; 4(1-2):145–7.

128. Almeida RF, Garcia MV, Cunha RC, Matias J, Labruna MB, Andreotti R. The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013 Feb;4(1-2):156-9.

129. Medeiros AP, Souza AP, Moura AB, Lavina MS, Bellato V, Sartor AA, Nieri-Bastos, FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Dec;106(8):926-30.

130. Pacheco RC, Arzua M, Nieri-Bastos FA, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. *J Med Entomol*. 2012 May;49(3):710-6.

131. Edwards KT, Goddard J, Jones TL, Paddock CD, Varela-Stokes AS. Cattle and the natural history of *Rickettsia parkeri* in Mississippi. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011 May;11(5):485-91.

132. Grasperge BJ, Wolfson W, Macaluso KR. *Rickettsia parkeri* infection in domestic dogs, Southern Louisiana, USA, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012 Jun;18(6):995-7.

133. Moraru GM, Goddard J, Murphy A, Link D, Belant JL, Varela-Stokes A. Evidence of antibodies to spotted Fever group rickettsiae in small mammals and quail from Mississippi. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013 Jan;13(1):1-5.

134. Pacheco RC, Horta MC, Moraes-Filho J, Ataliba AC, Pinter A, Labruna MB. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Sao Paulo,

Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. Biomedica. 2007 Sep;27(3):364-71.

135. Paddock CD, Finley RW, Wright CS, Robinson HN, Schrodt BJ, Lane CC, Ekenna O, Blass MA, Tamminga CL, Ohl CA, McLellan SLF, Goddard J, Holman RC, Openshaw JJ, Sumner JW, Zaki SR, Ereemeeva ME. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis and Its Clinical Distinction from Rocky Mountain Spotted Fever. Clinical Infectious Diseases. 2008;47(9):1188-96.

136. Raoult D, Paddock CD. *Rickettsia parkeri* infection and other spotted fevers in the United States. N Engl J Med. 2005 Aug 11;353(6):626-7.

137. Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ, Dail K, Johnson J, Watson DW. Tick-borne diseases in North Carolina: is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? Vector Borne Zoonotic Dis. 2008 Oct;8(5):597-606.

138. Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Guglielmone AA. Infection by *Rickettsia bellii* and Candidatus "*Rickettsia amblyommii*" in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. Microb Ecol. 2007 Jul;54(1):126-33.

139. Bermudez SE, Ereemeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, Motta JA, Dasch GA. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. J Med Entomol. 2009 Jul;46(4):856-61.

140. Hun L, Troyo A, Taylor L, Barbieri AM, Labruna MB. First report of the isolation and molecular characterization of *Rickettsia amblyommii* and *Rickettsia felis* in Central America. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011 Oct;11(10):1395-7.

141. Labruna M, Whitworth T, Bouyer D, McBride J, Camargo L, Camargo E, Popov V, Walker DH. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. J Med Entomol. 2004 Nov;41(6):1073-81.

142. Bermudez CS, Zaldivar AY, Spolidorio MG, Moraes-Filho J, Miranda RJ, Caballero CM, Mendoza Y, Labruna MB. Rickettsial infection in domestic mammals

and their ectoparasites in El Valle de Anton, Cocolé, Panama. *Vet Parasitol.* 2011 Apr 19;177(1-2):134-8.

143. Jiang J, Yarina T, Miller MK, Stromdahl EY, Richards AL. Molecular detection of *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma americanum* parasitizing humans. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010 May;10(4):329-40.

144. Zhang X, Ren X, Norris DE, Rasgon JL. Distribution and infection frequency of 'Candidatus *Rickettsia amblyommii*' in Maryland populations of the lone star tick (*Amblyomma americanum*) and culture in an *Anopheles gambiae* mosquito cell line. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Feb;3(1):38-42.

145. Parola P, Matsumoto K, Socolovschi C, Parzy D, Raoult D. A tick-borne rickettsia of the spotted-fever group, similar to *Rickettsia amblyommii*, in French Guyana. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007 Mar;101(2):185-8.

146. Ogrzewalska M, Pacheco RC, Uezu A, Ferreira F, Labruna MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic forest area in the state of Sao Paulo, Brazil, with isolation of rickettsia from the tick *Amblyomma longirostre*. *J Med Entomol.* 2008 Jul;45(4):770-4.

147. Ogrzewalska M, Uezu A, Labruna MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitol Res.* 2010 Mar;106(4):809-16.

148. Garcia-Garcia JC, Portillo A, Nuñez MJ, Santibanez S, Castro B, Oteo JA. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Apr;82(4):691-2.

149. Eremeeva ME, Bosserman EA, Demma LJ, Zambrano ML, Blau DM, Dasch GA. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Aug;72(8):5569-77.

150. Fornadel CM, Smith JD, Zawada SE, Arias JR, Norris DE. Detection of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* from the Eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013 Jan;13(1):67-9.

151. Beeler E, Abramowicz KF, Zambrano ML, Sturgeon MM, Khalaf N, Hu R, Dasch GA, Eremeeva ME. A focus of dogs and *Rickettsia massiliae*-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb;84(2):244-9.
152. Labruna M, Camargo LM, Camargo E, Walker D. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2005;127(2):169-74.
153. Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MP. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Feb;73(3):869-73.
154. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Nava S, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Exp Appl Acarol.* 2007;43(1):63-71.
155. Tomassone L, Nuñez P, Ceballos LA, Gurtler RE, Kitron U, Farber M. Detection of "Candidatus *Rickettsia* sp. strain Argentina" and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma ticks* (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Exp Appl Acarol.* 2010;52(1):93-100.
156. Abarca K, López J, Acosta-Jamett G, Lepe P, Soares JF, Labruna MB. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile. *J Med Entomol.* 2012 Jan;49(1):219-22.
157. Ferrari FA, Goddard J, Paddock CD, Varela-Stokes AS. *Rickettsia parkeri* and Candidatus *Rickettsia andeanae* in Gulf Coast ticks, Mississippi, USA. *Emerg Infect Dis.* 2012 Oct;18(10):1705-7.
158. Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M, Cruz C, Felices V, Guevara C, Mendoza L, Villaseca P, Sumner JW, Richards AL, Olson JG. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):4961-7.
159. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabó MP, Catroxo MH, Bouyer DH, Labruna MB. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., Infecting the

- Tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Aug;77(15):5207-11.
160. Tomassone L, Nuñez P, Ceballos LA, Gurtler RE, Kitron U, Farber M. Detection of "Candidatus *Rickettsia* sp. strain Argentina" and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Exp Appl Acarol.* 2010 Sep;52(1):93-100.
161. Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1078(1):523-9.
162. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):90-8.
163. Ogrzewalska M, Pacheco RC, Uezu A, Richtzenhain LJ, Ferreira F, Labruna MB. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009 Jul;103(5):413-25.
164. Barbieri AR, Romero L, Labruna MB. *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. *Pathog Glob Health.* 2012 Jul;106(3):188-9.
165. Ogrzewalska M, Literak I, Cardenas-Callirgos JM, Capek M, Labruna MB. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012 Sep;3(4):254-6.
166. Carmichael JR, Fuerst PA. Molecular detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* tick from nature. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010 Mar;10(2):111-5.
167. Wood H, Artsob H. Spotted Fever Group Rickettsiae: A Brief Review and a Canadian Perspective. *Zoonoses and Public Health.* 2012;59:65-79.
168. Miranda J, Portillo A, Oteo JA, Mattar S. *Rickettsia* sp. strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): a new proposed *Rickettsia* detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) from iguanas and free-living larvae ticks from vegetation. *J Med Entomol.* 2012 Jul;49(4):960-5.

169. Sabatini GS, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2010;47(5):913-6.
170. Patiño L, Afanador A, Paul JH. A Spotted Fever in Tobia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 1937;17(5):639-53.
171. Hidalgo M. Rickettsiosis y Ehrlichiosis en Colombia, Una Aproximación al Problema y a la Solución [Ph.D. Thesis]. Bogotá D.C.: Universidad de los Andes; 2009. 240 p.
172. Miranda AM, Flórez S, Mattar S. Alta seroprevalencia de rickettsiosis en trabajadores del campo en el Municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional-IQEN*. 2001;7(5):71-5.
173. Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, Keng C, Small M, Olano JP, Bouyer D, Castañeda E, Walker D, Valbuena G. Rocky Mountain Spotted Fever, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2007 Jul;13(7):1058-60.
174. Hidalgo M, Castañeda E, Méndez J, Travassos A, Valbuena G. Detección de anticuerpos contra arbovirus y rickettsias en sueros provenientes del programa centinela de entidades febriles, 2000 - 2004. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional-IQEN*. 2007;12(6):81-5.
175. Acosta J, Urquijo L, Díaz A, Sepúlveda M, Mantilla G, Heredia D, González M, Parra E, Rey G, Múnera G, Hidalgo M, Castañeda E, Segura O, Bolívar J, Galeano A, Giraldo MR, Rodríguez E, Cedeño N, Pérez C, Bayard V, Hernández I, Villalobos R. Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero-marzo de 2006. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional-IQEN*. 2006;11(12):177-92.
176. Hidalgo M, Miranda J, Heredia D, Zambrano P, Vesga JF, Lizarazo D, Mattar S, Valbuena G. Outbreak of Rocky Mountain Spotted Fever in Cordoba, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Feb;106(1):117-8.
177. Pacheco O, Giraldo M, Martínez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri I, Echevarría L, Parra E, Rey G. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos-Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia,

enero de 2008. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional-IQEN. 2008;13(10):145-56.

178. Hidalgo M, Sánchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker D, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group rickettsiae in a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Aug;77(2):378-80.

179. Hidalgo M, Vesga JF, Lizarazo D, Valbuena G. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Jun;80(6):1029-30.

180. Miranda J, Contreras V, Negrete Y, Labruna MB, Mattar S. Vigilancia de la infección por *Rickettsia* sp. en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) un modelo potencial de alerta epidemiológica en zonas endémicas. *Biomédica.* 2011 Jun;31(2):216-21.

181. Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical um guia ilustrado para identificação de espécies Instituto Butantan; 2006.223 p.

182. Keirans JE, Litwak TR. Pictorial key to the adults of hard ticks, family Ixodidae (Ixodida: Ixodoidea), east of the Mississippi River. *J Med Entomol.* 1989 Sep;26(5):435-48.

183. Jones E, Clifford C, Keirans JE, Kohls GM. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodidae) with a key to the species of the *Amblyomma* in the western hemisphere. *Brigham Young University Science Bulletin, Biological Series.* 1972;17:1-19.

184. QIAGEN. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. 2006. p. 62.

185. Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser GP, Fish D. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Mar;56(3):339-42.

186. Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 1998 Jun;84(6):478-84.

187. Webb L, Carl M, 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(3):530-4.
188. Miranda J, Mattar S. Molecular detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia* sp. strain Colombianensi in ticks from Cordoba, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014 Mar;5(2):208-12.
189. Quintero JC, Londoño AF, Díaz FJ, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Rodas JD. Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia. *Biomédica.* 2012;33.
190. Bermudez S, Miranda R, Zaldivar Y, Gonzalez P, Berguido G, Trejos D, Pascale JM, Labruna M. Detección de *Rickettsia* spp. en ectoparásitos de animales domésticos y silvestres de la Reserva Natural Privada Cerro Chucantí y comunidades aledañas, Panamá, 2007-2010. *Biomédica.* 2012 Jun;32(2):189-95.
191. Samish M, Pipano E, Hadani A. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. *Am J Vet Res.* 1993 Mar;54(3):411-4.
192. Bremer WG, Schaefer JJ, Wagner ER, Ewing SA, Rikihisa Y, Needham GR, Jittapalapong S, Moore DL, Stich RW. Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 2005 Jul 15;131(1-2):95-105.
193. Stiller D, Coan ME. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. *Vet Parasitol.* 1995 Mar;57(1-3):97-108.
194. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792-7.
195. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* 2004 Aug 19;5:113.
196. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987 Jul;4(4):406-25.

197. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993 May;10(3):512-26.
198. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000. 333 p.
199. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.
200. Valbuena E. Detección del gen *gltA*, conservado en el género *Rickettsia*, mediante PCR convencional a partir de garrapatas (Ixodidae) recolectadas en equinos del Municipio de Villeta, Cundinamarca. [Tesis Microbiología Industrial] Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana; 2012. 15 p.
201. Toledo RS, Tamekuni K, Filho MFS, Haydu VB, Barbieri ARM, Hiltel AC, Pacheco RC, Labruna MB, Dumler JS, Vidotto O. Infection by Spotted Fever Rickettsiae in People, Dogs, Horses and Ticks in Londrina, Parana State, Brazil. *Zoonoses and Public Health.* 2011;58(6):416-23.
202. De Lemos ER, Machado RD, Coura JR, Guimaraes MA, Chagas N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the State of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996 Nov-Dec;38(6):427-30.
203. Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvao MA, Mafra CL, Vidotto O, Schumaker TT, Walker DH. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Jul;71(1):93-7.
204. Serra-Freire NM. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Para, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010 Jul-Sep;19(3):141-7.

205. Perez-Osorio CE, Zavala-Velazquez JE, Arias Leon JJ, Zavala-Castro JE. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg Infect Dis*. 2008;14: 1019-1023.
206. Abdad MY, Stenos J, Graves S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. *Emerg Health Threats*. 2011;4: 1-7.
207. Reif KE, Macaluso KR. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol*. 2009;46:723-736.
208. Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CV, Figueira FC, Labruna MB, Gennari SM, Walker DH, Galvao MA. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2006 Mar;22(3):495-501.
209. Faccini-Martínez A, Forero-Becerra E, Cortés-Vecino JA, Polo-Terán L, Jácome J, Vargas J, Valbuena G, Hidalgo M. Caso probable de fiebre manchada (*Rickettsia felis*) transmitida por pulgas. *Biomédica*. 2013;33(Sup1):9-13.
210. Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CC, Silva A, Jr., Almeida MR, Almada G, Bouyer DH, Galvao MA, Mafra C. 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):191-4.
211. Yeruham I, Rosen S, Braverman Y. *Ctenocephalides felis* flea infestation in horses. *Vet Parasitol*. 1996 Apr;62(3-4):341-3.