



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá



Grupo de investigación  
enfermedades infecciosas

**Estudio de seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales mamíferos, determinación de la incidencia en humanos y detección molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas del municipio de Villeta (Cundinamarca).**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**CHRISTIAN DAVID BARRETO VARGAS**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de:

**BACTERIOLOGO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE PREGRADO  
BOGOTÁ, D.C.  
2013**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la resolución No 13 de Julio de 1946**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”



## DEDICATORIA

*A Dios por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y sabiduría todo es posible. A mi madre, Otilia Vargas, quien con su amor, apoyo y comprensión incondicional me ha guiado por el camino del bien y me brindo la oportunidad de terminar una etapa más en mi vida. A mis primas, Vivian y Diana, por acompañarme siempre en los momentos más felices y por tener una palabra de aliento en los difíciles. A mis abuelitos, Luis Antonio Vargas y Ana Rosa Arias, por todo el amor y apoyo recibido. A mi hermano Sebastián Barreto Vargas y Matías por estar siempre ahí.*

*Christian Barreto Vargas.*



## AGRADECIMIENTOS

A Dios, A la doctora Marylin Hidalgo por depositar su confianza en mí, por su apoyo, sus conocimientos y por los consejos recibidos. A Álvaro, Karent, Jenny y todos los demás miembros del laboratorio de Bacteriología Especial por su invaluable apoyo en la realización de este trabajo de grado. A mis amigos por su apoyo y colaboración. A la Pontificia Universidad Javeriana por su excelente formación como bacteriólogo.



# **Estudio de seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales mamíferos, determinación de la incidencia en humanos y detección molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas del municipio de Villeta (Cundinamarca).**

## **RESUMEN**

**Antecedentes:** Las rickettsiosis son entidades clínicas de tipo zoonótico causadas por bacterias intracelulares obligadas del género *Rickettsia* que son transmitidas por artrópodos hematófagos. Según las características genotípicas este género se divide en cuatro grupos, el grupo de las fiebres manchadas que se transmite por la picadura de garrapatas, el grupo del tifus transmitido por piojos y pulgas, el grupo transicional transmitido por ácaros y finalmente el grupo ancestral. La rickettsiosis más letal es la fiebre manchada de las montañas rocosas causada por *R. rickettsii*, aunque también existe el tifus endémico y el tifus epidémico causado por *R. typhi* y *R. prowazekii*, respectivamente. En Colombia la rickettsiosis se reportó por primera vez en 1937 por Luis Patiño quien la describió como un síndrome febril con signos inespecíficos, meses después se comprobó que el agente causal fue *R. rickettsii*, sin embargo, desde entonces poco se supo de la circulación de estos microorganismos en el país. En los últimos años se han presentado varios brotes de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas entre los que se destacan los ocurridos en el municipio de Villeta (Cundinamarca) en 2003 y 2004, Necoclí y Turbo (Antioquía) en 2006 y 2008, y en Los Córdoba (Córdoba) en 2007. Dado que esta enfermedad no es de notificación obligatoria no se tienen datos recientes de esta zoonosis emergente. Adicionalmente, varios estudios han señalado la importancia de evaluar la seroprevalencia de *Rickettsia* spp. en animales mamíferos con el fin de monitorear el comportamiento de este género bacteriano en determinada área endémica. Trabajos previos mostraron una prevalencia de IgG en caninos y equinos del 18.2% y 16.3% respectivamente, pero en bovinos no hay datos a la fecha en Latinoamérica. De igual forma, se ha descrito que la garrapata *Amblyomma cajennense* es uno de los vectores más relacionados con la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina. El objetivo de este trabajo es determinar la seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en caninos, equinos y bovinos del municipio de Villeta, la incidencia de casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas entre Enero 2012 y Enero 2013 en pacientes que ingresaron al hospital de Villeta y finalmente determinar la tasa mínima de infección en garrapatas *A. cajennense* recolectadas en dicho municipio para tener una aproximación a la epidemiología de esta infección en esta zona endémica.

**Materiales y métodos:** *i)* Se determinó el título máximo de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en sueros provenientes de caninos, equinos y bovinos del municipio de Villeta mediante inmunofluorescencia indirecta. *ii)* La incidencia de casos de rickettsiosis entre Enero 2012 y Enero 2013 en Villeta se evaluó mediante la detección de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas por inmunofluorescencia indirecta en muestras de suero pareadas. *iii)* Para determinar la tasa mínima de infección de *Rickettsia* spp en *A. cajennense* se realizó la detección de genes específicos de este género (*OmpB*) por medio de PCR convencional.



**Resultados:** Se detectó que la seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en caninos, equinos y bovinos del municipio de Villeta fue del 14.4%, 33.7% y 50% respectivamente. La incidencia de casos de rickettsiosis entre Enero del 2012 y Enero del 2013 fue de 5.6 casos por cada 10000 habitantes. La tasa mínima de infección de *Rickettsia* spp. en *A. cajennense* fue de 5.9%

**Conclusiones:** En el presente trabajo se confirmó que las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas hacen parte de los agentes etiológicos de síndromes febriles agudos en el municipio de Villeta (Cundinamarca). El análisis de seroprevalencia en animales mamíferos demostró la constante presencia de estos microorganismos en esta zona, además, la alta incidencia de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas encontrada en humanos se correlaciona con la tasa mínima de infección determinada en garrapatas de la especie *A. cajennense* recolectadas en esta área endémica, la cual es mayor a la reportada en Europa, Estados Unidos y Brasil.



## INDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Justificación	3
3. Marco teórico y referentes conceptuales	
3.1. Características generales de <i>Rickettsia</i> spp.	5
3.2. Ciclo natural de las garrapatas	6
3.3. Infección de las garrapatas con rickettsias del grupo de las fiebres manchadas	7
3.4. Patogénesis	9
3.4.1. Manifestaciones clínicas de la RMSF	11
3.5. Papel de los animales en la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas	12
3.6. Diagnóstico	
3.6.1. Serología	13
3.6.2. Cultivo	14
3.6.3. Biología molecular	14
3.7. Características de <i>Amblyomma cajennense</i>	14
3.7.1. Preferencias ecológicas de <i>Amblyomma. cajennense</i>	16
4. Objetivos	17
5. Metodología	
5.1. Diseño del estudio	18
5.2. Área del estudio	18
5.3. Población y muestra	18
5.3.1. Recolección de sueros de equinos, caninos y bovinos	18
5.3.2. Recolección de sueros humanos	18
5.3.3. Recolección de garrapatas ( <i>A. cajennense</i> ) del municipio de Villeta	19
5.3.4. Definición de variables	19
5.4. Procedimiento	
5.4.1. Titulación de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en sueros de hospederos mamíferos	20
5.4.2. Preparación de grupos (pools) de garrapatas	21
5.4.3. Extracción y cuantificación del DNA	21
5.4.4. PCR para la detección de <i>Rickettsia</i> spp.	21
5.4.5. Análisis de datos	22
6. Resultados	
6.1. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos, caninos y bovinos provenientes del municipio de Villeta (Cundinamarca)	
6.1.1. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos	23
6.1.2. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en caninos	23

6.1.3. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en bovinos	23
6.2. Incidencia de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en humanos entre Enero del 2012 – Enero del 2013.	24
6.3. Detección molecular de <i>Rickettsia</i> spp. en garrapatas ( <i>A. cajennense</i> ) recolectadas del municipio de Villeta (Cundinamarca)	26
6.4. Características y preferencias ecológicas de <i>A. cajennense</i> en el municipio de Villeta (Cundinamarca)	28
7. Discusión	31
8. Conclusiones	35
9. Recomendaciones	36
10. Bibliografía	37
11. Anexos	
Anexo 1: Inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra <i>Rickettsias</i>	43
Anexo 2: Protocolo extracción de DNA a partir de garrapatas	46
Anexo 3: Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos	47
Anexo 4: Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en caninos	48
Anexo 5: Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en bovinos	49

## 1. INTRODUCCION

Las rickettsiosis son entidades clínicas de carácter zoonótico causadas por bacterias pertenecientes al género *Rickettsia*, las cuales son transmitidas por artrópodos hematófagos como garrapatas, pulgas, piojos y ácaros (1). Con base en análisis filogenéticos, este género bacteriano se divide en cuatro grupos: el grupo de las fiebres manchadas (*R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. conorii*, *R. parkeri*, entre otras), grupo del tifus (*R. typhi* y *R. prowazekii*), grupo transicional (*R. akari*, *R. australis* y *R. felis*) y el grupo ancestral (*R. canadiensis* y *R. bellii*) (2). El género *Rickettsia* actualmente se encuentra conformado por 25 especies reconocidas, aunque en los últimos años, se han identificado varias cepas las cuales aún no están totalmente caracterizadas (3, 4). Estas bacterias tienen una distribución mundial y su ecología está determinada por factores ambientales, la presencia de vectores específicos que influyen en el establecimiento y la epidemiología de determinadas rickettsiosis en diferentes regiones del mundo (5).

En América, durante el siglo XX, se reconocieron tres rickettsiosis las cuales son la fiebre manchada de las montañas rocosas o RMSF (Rocky Mountain Spotted Fever) cuyo agente etiológico es *R. rickettsii*, el tifus endémico y epidémico causado por *R. typhi* y *R. prowazekii*, respectivamente (5). Sin embargo, en las últimas décadas se han descrito casos de fiebre manchada transmitida por pulgas causada por *R. felis* y el rickettsialpox causado por *R. akari* en países como Brasil, Costa Rica, México, entre otros (1).

De las rickettsiosis anteriormente mencionadas, la RMSF es la más letal de todas. Esta enfermedad fue descrita inicialmente por Edward Maxey en 1899 en Norteamérica (6) pero solo fue hasta 1906 cuando el patólogo Howard Ricketts logró determinar que esta infección era provocada por microorganismos que se transmitían por la picadura de la garrapata *Dermacentor andersoni* y que este vector transmitía la bacteria a su progenie (7, 8). Posteriormente, se comenzaron a identificar casos de RMSF transmitida por garrapatas en Estados Unidos, Centroamérica y Suramérica (9). En 1925 se realizó la descripción clínica de la enfermedad a partir de un niño de Indiana (Estados Unidos) que luego fue confirmado por hallazgos de laboratorio. Desde ese entonces hasta la actualidad esta infección ha sido descrita como una zoonosis potencialmente fatal cuyo diagnóstico siempre es un reto para los clínicos (9, 10). En las últimas décadas se ha despertado un gran interés en varios países de Latinoamérica por su carácter re-emergente y/o emergente debido a la presentación de casos fatales y brotes de alta letalidad (11). Por el contrario, en otros países como Estados Unidos, han permanecido como enfermedades endémicas de presentación estacional, asociadas a la circulación de sus vectores o condicionadas por cambios ecológicos (9, 11).

En Latinoamérica, *R. rickettsii* ha mostrado un claro incremento en su distribución y expansión en los últimos años, razón por la cual se han realizado varios estudios con el fin de esclarecer las características epidemiológicas de la RMSF, especialmente en la identificación de sus vectores y el ciclo de vida del microorganismo (1). Hoy en día se ha reconocido a las garrapatas de la familia *Ixodidae* y el género *Amblyomma*, especialmente *Amblyomma cajennense* (*A. cajennense*) como uno de los vectores más implicados en la transmisión de *R.*

*rickettsii* (12). *A. cajennense* está ampliamente distribuida en América, puesto que se encuentra desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, estableciendo un factor muy importante a tener en cuenta respecto a la transmisión de la bacteria, además, esta garrapata tiene una baja especificidad de hospedero, es decir, puede infestar a varios animales tales como equinos, bovinos, caninos, aves y humanos (13).

Adicionalmente, los animales mamíferos juegan un papel importante en el ciclo de vida de estos microorganismos dado que llevan las garrapatas infectadas al entorno humano (11). Estudios previos han mostrado la importancia de evaluar la seroprevalencia de *Rickettsia* spp. en animales como equinos, bovinos, caninos, entre otros, con el fin de usarlos como animales centinela para monitorear la circulación de estos microorganismos en zonas endémicas antes de que casos humanos sean detectados (14).

En Colombia, desde comienzos de la década del 2000, se han identificado varios casos de RMSF con altas tasas de mortalidad (15). Desafortunadamente, esta infección no es de notificación obligatoria ocasionando la ausencia de datos actualizados sobre esta zoonosis en el país. Igualmente, al ser una enfermedad que se presenta como un síndrome febril agudo, estas bacterias no se suelen incluir en el diagnóstico diferencial por lo que comúnmente se suele confundir con dengue, leptospira, fiebre amarilla, entre otros (16).

Teniendo en cuenta lo anterior, debido a la coexistencia de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas con los vectores, los animales mamíferos y la entrada del hombre al ciclo, con la posterior adquisición de la infección, este trabajo tiene como finalidad hacer una aproximación a la epidemiología de la RMSF en el municipio de Villeta (Cundinamarca, Colombia), la cual es una zona endémica para estos microorganismos, mediante el análisis de seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales domésticos (equinos, caninos y bovinos), la determinación de la incidencia de esta infección en pacientes con episodios febriles que ingresaron al hospital de Villeta entre Enero del 2012 hasta Enero del 2013 y finalmente detectar genes específicos de *Rickettsia* spp. en garrapatas de la especie *A. cajennense* recolectadas de este municipio.

## 2. JUSTIFICACION

La rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas son enfermedades potencialmente letales que tienen una distribución mundial. En Europa hay varias especies que se asocian a esta patología, por ejemplo, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*, *R. conorii*, *R. massiliae*, entre otras (1), mientras que en países del continente americano como Estados Unidos, Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Chile, Argentina, Brasil y Colombia se ha reportado a *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. honei*, y más recientemente a *R. amblyommii*, como agentes etiológicos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas (3). La RMSF causada por *R. rickettsii* suele tener diferentes nombres de acuerdo a su localización geográfica, por ejemplo, en Brasil se conoce como Fiebre Maculosa Brasileira y en Colombia se conoce como la Fiebre de Tobia (1).

En Norteamérica, especialmente en Estados Unidos donde esta enfermedad es endémica, se presentaron 431 casos de RMSF entre 1873 y 1920 en los estados de Oklahoma, Tennessee y Arkansas (17). Entre 1997 y 2002 la incidencia anual de esta enfermedad fue de 2.2 casos por cada millón de habitantes, es decir, cada año se reportaron aproximadamente entre 250 – 1200 casos de RMSF en este país. Sin embargo, es importante destacar que en los años 2004, 2005 y 2006 se presentaron 1713, 1936 y 2092 casos respectivamente, lo que representa el mayor número de casos reportados en ese país donde la mayor incidencia se presentó en niños entre 5 – 9 años y adultos entre 40 – 64 años (9).

Con respecto a Latinoamérica, Brasil fue el primer país en reportar la infección por *R. rickettsii* en el año 1920, sin embargo, después de la notificación de varios informes en las décadas de los años 30 y 40 la cantidad de reportes disminuyó considerablemente, pero desde finales de los años 80 hasta la actualidad se ha evidenciado un claro resurgimiento de la enfermedad especialmente en los estados de Sao Paulo y Minas Gerais (18) cuyas tasas de letalidad están entre el 20 – 30%, las cuales son mucho más altas que las reportadas en Estados Unidos que están entre 0.5 – 1.4% (19, 20). *Eremeeva, et al*, 2003 (21) afirman que esta diferencia tan marcada se debe a las dificultades en el reconocimiento, diagnóstico y tratamiento de la infección e incluso la presencia de cepas más virulentas de *R. rickettsii* respecto a otras regiones de América. Entre los años de 1997 – 2009 se informaron 808 casos de RMSF de los cuales el 45.1% se presentaron en el estado de Sao Paulo, especialmente entre los meses de Junio y Octubre dado que se presentó una mayor actividad de las formas inmaduras de *A. cajennense*, el cual es el principal vector de *R. rickettsii* en ese país (20). Igualmente, cabe destacar que esta es la rickettsiosis de mayor importancia en Brasil, motivo por el cual es de notificación obligatoria y se encuentra bajo estricta vigilancia epidemiológica (5).

En Colombia la infección fue descrita por primera vez en 1937 por el Doctor Luis Patiño, quien informó de un síndrome febril con signos inespecíficos en el “Valle de Tobia”, que se conoce hoy en día como el municipio de Tobia, ubicado en el departamento de Cundinamarca, donde la letalidad del brote alcanzó el 95%, meses después se demostró que el agente causal fue *R. rickettsii* (22), desde entonces poco se supo de la circulación de *Rickettsia* spp. en el país. Sin embargo, casi 70 años después se confirmaron dos casos mortales de RMSF en la misma región

(23), además en el año 2005 se realizó un estudio serológico en habitantes del municipio de Villeta (Cundinamarca), cerca de Tobia, el cual reveló una seroprevalencia del 40.3% indicando la permanencia y frecuente exposición a rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en dicha región (24, 25). Posteriormente en los años 2006, 2007 y 2008 se reportaron nuevos casos de rickettsiosis en los municipios de Necoclí (Antioquía), Las Córdoba (Córdoba) y Turbo (Antioquía), respectivamente, con tasas de letalidad entre el 26.6% - 36% (15, 26 – 28).

La RMSF es una zoonosis y las garrapatas hacen parte de los artrópodos vectores más implicados en la transmisión de estos patógenos. En Latinoamérica, *A. cajennense*, se ha identificado como un vector claramente implicado en la transmisión de *R. rickettsii* (12, 29). Esta garrapata infesta principalmente a equinos y roedores (chigüiros o zarigüeyas) aunque comúnmente se alimenta de otros mamíferos como caninos, bovinos e inclusive humanos (30). Teniendo en cuenta lo anterior, estudios previos realizados en Europa, Estados Unidos y Brasil han mostrado la importancia de utilizar animales mamíferos como centinelas, es decir, monitorear el comportamiento de estos microorganismos en áreas endémicas (14). En un estudio realizado por *Hidalgo, et al*, 2009 (31) en equinos y caninos del municipio de Villeta, se reportó una prevalencia de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas del 16.3% y 18.2% respectivamente. Respecto a bovinos, en Latinoamérica no se han realizado estudios de seroprevalencia de *Rickettsia* spp. Sin embargo, se han realizado estudios en las islas del Caribe (St. Kitts and Nevis) y en Zimbabwe donde se ha reportado una seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en bovinos mayor al 50% (32 – 34).

En Colombia, los reportes epidemiológicos acerca de la incidencia de esta rickettsiosis son escasos ocasionando que la enfermedad sea poco conocida e investigada. Hasta el momento no hay datos recientes de la seroprevalencia en zonas endémicas del país ni mucho menos se ha detectado la presencia de estos microorganismos en un vector claramente implicado en su transmisión como *A. cajennense*. Dada esta situación en el país, donde se han venido presentando brotes de RMSF con altas tasas de mortalidad, es necesario detenerse en este punto y analizar el comportamiento de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales centinela y aún mas, detectar su presencia en su vector mas implicado a lo largo de Latinoamérica, con el fin de crear e implementar medidas con impacto en salud pública para disminuir la morbilidad y mortalidad asociada a esta enfermedad infecciosa.

### 3. MARCO TEORICO Y REFERENTES CONCEPTUALES

#### 3.1. Características generales de *Rickettsia* spp.

El género *Rickettsia* incluye bacterias de la familia *Rickettsiaceae*, del orden de los *Rickettsiales*, subdivisión  $\alpha$  de la clase proteobacteria. Son cocobacilos aerobios, pleomorfos, intracelulares obligados que miden aproximadamente 0.3 – 0.5  $\mu\text{m}$  por 1 – 2  $\mu\text{m}$ , los cuales se reproducen mediante fisión binaria en el citoplasma y/o núcleo de las células eucariotas (11, 35). La pared celular es igual a la de bacterias Gram negativas ya que se encuentra formada principalmente por LPS (10), sin embargo, las rickettsias no se pueden teñidas con la tinción de Gram pero retienen la fuscina básica cuando se usa la tinción de Gimenez o Giemsa (3).

Con respecto a la taxonomía de las rickettsias, el análisis del gen 16sRNA solo es útil para definir el género. No obstante, para determinar la especie y clasificar los miembros de este género en el respectivo grupo se ha propuesto analizar otros 4 genes (*gltA*, *OmpB*, *OmpA* y *sca4*) (4).

En la siguiente tabla (Ver tabla 1) se resumen varias de las características principales del género *Rickettsia* según los 4 grupos del género *Rickettsia* (3):

Tabla N° 1

Grupo	Distribución geográfica	Vector	°T óptima de crecimiento	Localización intracelular	Contenido GC (%)	Tamaño del genoma
Grupo de las fiebres manchadas	Mundial	Garrapatas	32°C	Núcleo y citoplasma	32 – 33	1.2 – 1.3 Mb
Grupo del tifus	Mundial	Piojos y pulgas	35°C	Citoplasma	29	1.1 Mb
Grupo transicional	Mundial	Garrapatas, ácaros y pulgas	32 – 35°C	Núcleo y Citoplasma	32 – 33	1.3 – 1.5 Mb
Grupo ancestral	América	Garrapatas	32 – 35°C	Citoplasma	29	1.1 – 1.5 Mb

Es importante destacar que los miembros del grupo de las fiebres manchadas y el transicional tienen la capacidad de polimerizar la actina, lo que les permite entrar al núcleo de la célula hospedera (célula endotelial). Por el contrario, el grupo del tifus no posee dicha habilidad, motivo por el cual su localización dentro de la célula huésped está restringida únicamente al citoplasma (3). Por otro lado, no se ha reportado que los miembros del grupo ancestral (*R. canadiensis* y *R. bellii*) sean patógenas para los humanos aunque han sido aisladas de garrapatas en países como Brasil, Argentina y Perú (36 – 38).

Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado un incremento de nuevas especies de *Rickettsia* de patogenicidad desconocida, muchas de ellas aisladas de garrapatas (39). Algunas de estas especies previamente fueron consideradas no patógenas, pero recientemente demostraron que si pueden generar patologías en humanos como es el caso de *R. slovacae*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae* y *R.*

*monacensis* en Europa (39, 40). Estos hallazgos demuestran que cualquier nueva especie de *Rickettsia* descrita en garrapatas debe ser considerada potencialmente patógena para humanos (1).

### 3.2. Ciclo natural de las garrapatas

Las garrapatas hacen parte de los artrópodos vectores de mayor importancia en la transmisión de microorganismos al hombre y los animales (5, 41). Estos artrópodos pertenecen al orden de los Parasitiformes, suborden Ixodida los cuales se dividen en tres familias: *Ixodidae* que comprenden a las garrapatas de cuerpo duro, *Argasidae* que son garrapatas de cuerpo blando y *Nuttalliellidae* que solo comprende a una especie, no patógena para humanos, llamada *Nuttalliella namaqua*, la cual solamente se encuentra en algunos países de África como Tanzania, Namibia y Sudáfrica (42). En Latinoamérica, se encuentran 145 especies de garrapatas divididas en las familias *Argasidae* (52 especies) e *Ixodidae* (93 especies). El 55% de las especies de *Ixodidae* reportadas en Latinoamérica corresponden al género *Amblyomma*, el cual es de alta importancia médica (29).

Con respecto al ciclo de vida de las garrapatas, este consiste en tres etapas: las larvas que salen de los huevos, las ninfas que se desarrollan a partir de las larvas y finalmente los adultos. De acuerdo con el número de animales que requieran para completar su desarrollo las garrapatas se pueden clasificar en tres tipos (43):

- ✓ De un hospedero: Comprende las garrapatas que pasan desde el estadio de larva al de adulto sin cambiar de hospedero, abandonándolo solamente cuando están ingurgitadas y desprendiéndose de él para depositar sus huevos en el suelo. De estos huevos saldrán las larvas que sufrirán una muda<sup>1</sup>, se convierten en ninfas y después alcanzan las fases de adulto sobre el animal infestado. Ejemplo: *Boophylus annulatus*.
- ✓ De dos hospederos: Son las que cumplen sus fases de larva y de ninfa en un mismo hospedero y lo abandonan para mudar en el suelo, mudar a estadios adultos y buscar un segundo hospedero para continuar con su ciclo de vida. Ejemplo: *Rhipicephalus evertsi*.
- ✓ De tres hospederos: Estas garrapatas se caracterizan porque siendo larvas, infestan 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, que es nuevamente abandonado y ya en el suelo pasan a un estadio adulto y vuelven a parasitar a un tercer hospedero. Ejemplo: *Amblyomma cajennense*.

---

<sup>1</sup> Muda: Transición de larvas a ninfas y de ninfas a adultos que se lleva a cabo mediante metamorfosis con pérdida de la cutícula.

### 3.3. Infección de las garrapatas con rickettsias del grupo de las fiebres manchadas

Las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas son transmitidas por la picadura de garrapatas de la familia *Ixodidae* y dependiendo del área geográfica se conocen varias especies que sirven como vectores de estos microorganismos, por ejemplo, en Estados Unidos los vectores implicados son *Dermacentor andersoni* (*D. andersoni*), *Dermacentor variabilis* (*D. variabilis*) y más recientemente *R. sanguineus* (44), mientras que en Latinoamérica las garrapatas más implicadas son *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. triste*, *A. variegatum*, *A. aureolatum*, *A. oblongoguttatum*, *A. parvum* y *R. sanguineus* (30).

Las garrapatas de la familia *Ixodidae* tienen una diferencia marcada con otros artrópodos hematófagos ya que en las células epiteliales que recubren el lumen del intestino medio se fagocita y digiere la sangre intracelularmente. Varios estudios han señalado que este proceso es de suma importancia en la asociación de las garrapatas con bacterias intracelulares como las rickettsias, sin embargo, los mecanismos fisiológicos que median las interacciones entre estos microorganismos y los hospederos artrópodos aún no se encuentran completamente definidos (45).

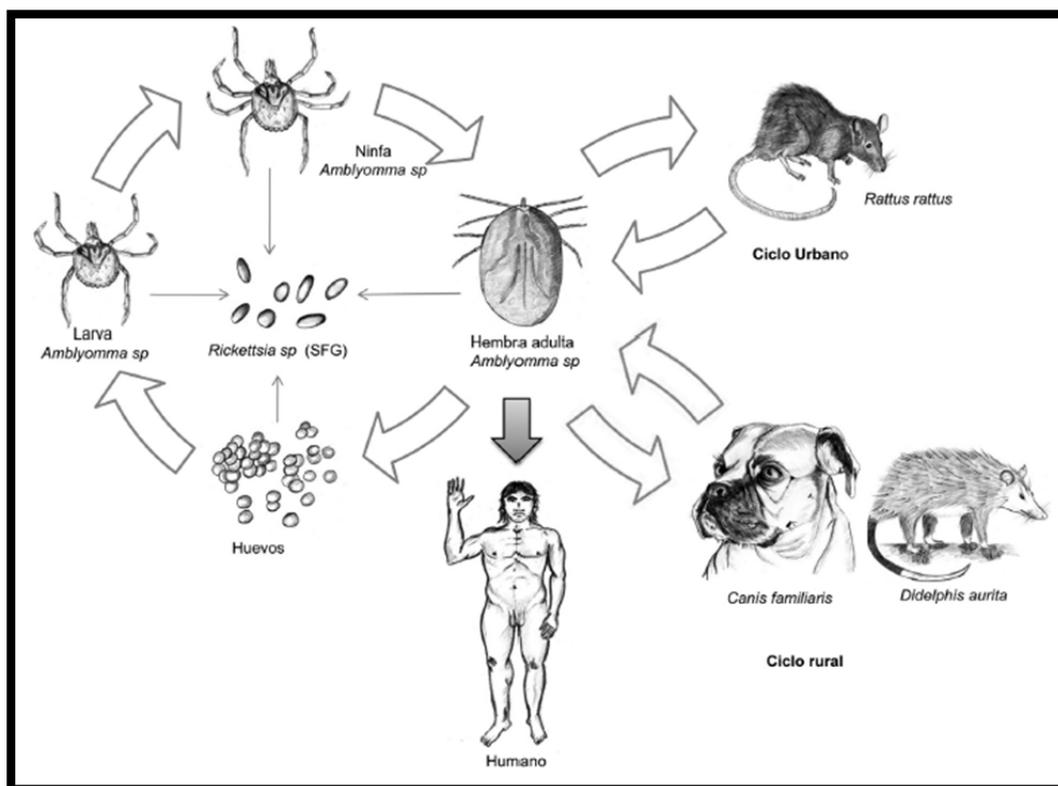
En estudios realizados por *Niebylski, et al*, 1999 (46) se demostró que rickettsias del grupo de las fiebres manchadas como *R. rickettsii* pueden transmitirse de estadios inmaduros (larvas y ninfas) al estadio adulto, es decir una transmisión transestadio y de una garrapata a su descendencia lo que se conoce como transmisión transovárica. En la mayoría de los casos el paso del microorganismo a un hospedero vertebrado no es esencial para la supervivencia de la bacteria debido a que las rickettsias pueden mantenerse por largos periodos de tiempo en la naturaleza a través de la transmisión transestadio y transovárica, esta última se ha descrito que influye en la virulencia de las rickettsias (47). Adicionalmente, otra de las formas de transmisión es la horizontal, en la que un mamífero infectado desarrolla una rickettsemia que es capaz de infectar otras garrapatas presentes en el animal (12, 48). Si bien es cierto que dichos mecanismos de transmisión logran mantener a las rickettsias por periodos de tiempo prolongados, esta infección tiene consecuencias negativas para el vector, *Burgdorfer, et al*, 1975 (49) en sus estudios lograron comprobar que hay una reducción en la fertilidad de las garrapatas de la especie *D. andersoni*, explicando de esta forma la baja prevalencia de garrapatas infectadas, pudiendo eventualmente matarla lo que conllevaría a su propia extinción. Existe otro factor, recientemente descrito, que afecta la distribución de estas bacterias en las garrapatas que se conoce como interferencia de la rickettsia, este mecanismo consiste en que la garrapata se infecta con una especie del género *Rickettsia* no patógena generando una protección contra otras especies como *R. rickettsii*, básicamente se produce una competencia entre las bacterias por el microambiente del vector impidiendo una transmisión transovárica (50).

Los principales hospederos de las garrapatas implicadas en la transmisión de estos microorganismos son animales domésticos, silvestres y aves que pueden ser infestados por cualquier estadio parasitario de la garrapata (12). En general, las garrapatas tienen una baja capacidad para desplazarse, motivo por el cual su dispersión está ligada al movimiento de animales hospederos, por ende, animales domésticos como caninos, equinos y bovinos tienen un rol importante en la

epidemiología de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas dado que pueden llevar garrapatas infectadas al entorno humano convirtiéndolos en huéspedes accidentales (51, 52).

En el siguiente diagrama (Ver Figura 1) se puede observar con mayor claridad como es el ciclo de vida de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, en el cual la garrapata ingurgitada y adulta puede adquirir la infección y transmitirla por la vía transovárica o transestadio, como se mencionó anteriormente los tres estadios en el desarrollo de la garrapata (larva, ninfa y adulto) son potenciales vectores y pueden transmitir estos microorganismos a sus reservorios. En este modelo, existe un ciclo urbano en el cual roedores como *Rattus rattus* podrían servir como reservorios de la enfermedad. Por otro lado, en el ciclo rural participan caninos, equinos y algunos marsupiales que pueden actuar como reservorios “amplificadores” para estas rickettsias, cuyo mecanismo será explicado más adelante. Finalmente, cuando el humano entra en contacto con los vectores (a través de la picadura) por la convivencia con animales domésticos infectados o exposición accidental al vector se adquiere la enfermedad (11, 53).

**Figura 1:** Ciclo de vida rickettsias del grupo de las fiebres manchadas



Tomado de Velez, et al. Rickettsiosis una enfermedad letal emergente y reemergente en Colombia. *Universitas Scientarum* 2012; **17**: 82-99.

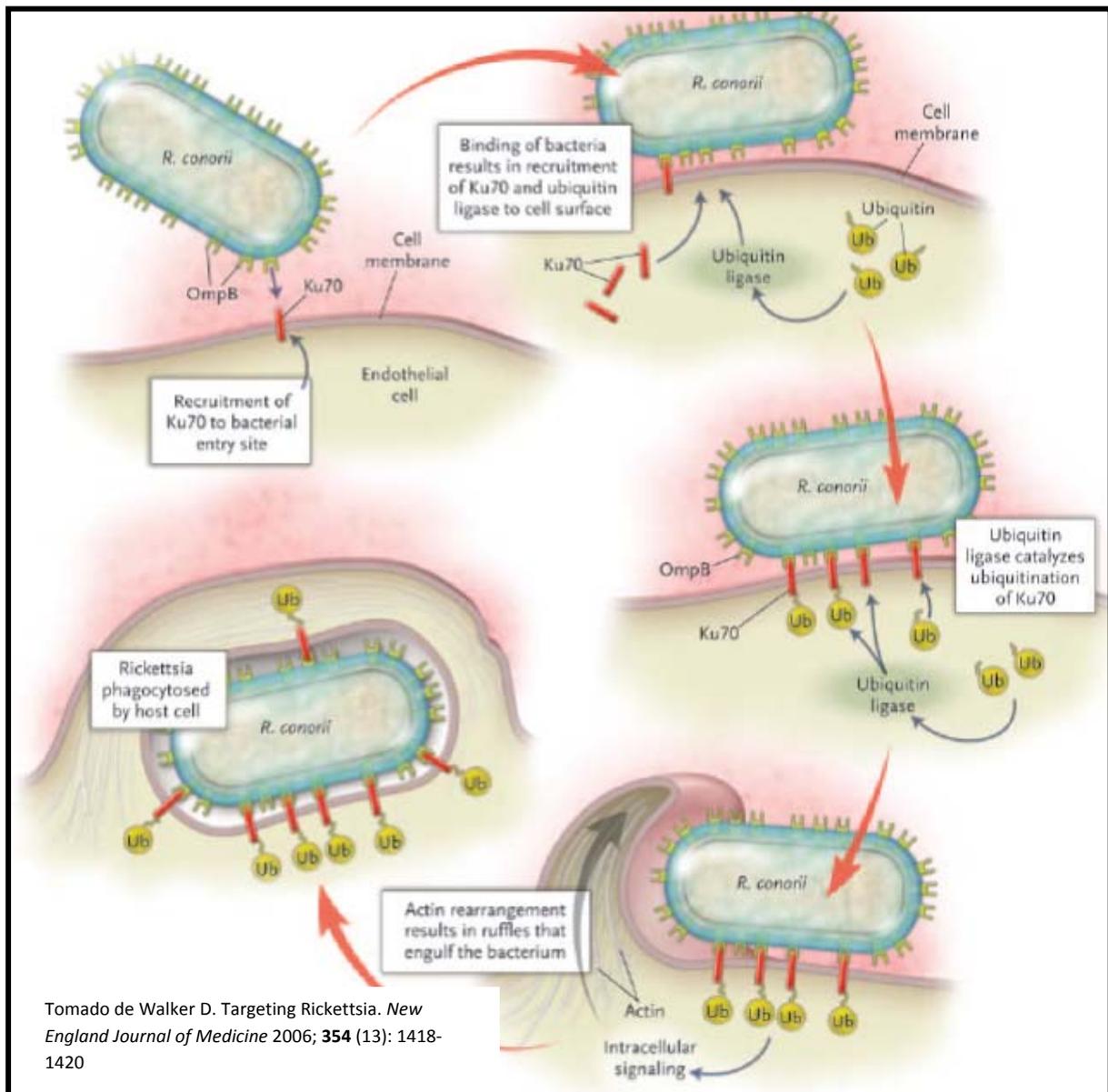
### 3.4. Patogénesis

Cuando las rickettsias ingresan al huésped humano después de ser inoculadas desde las glándulas salivales de la garrapata durante su alimentación (entre 6 y 24 horas continuas de hematofagia), estas bacterias invaden y proliferan mediante fisión binaria en el citoplasma y núcleo de las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre. Además, las rickettsias pueden infectar otras células como monocitos, macrófagos y en menor proporción a los hepatocitos (54, 55).

Las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas entran a la célula mediante fagocitosis inducida dado que poseen dos proteínas de membrana externa que son *OmpA* (*sca 0*) y *OmpB* (*sca 5*) que junto a las proteínas *sca 1*, *sca 2* y otros lipopolisacáridos le permiten la adhesión a la célula. Cabe destacar que *OmpA*, *OmpB*, *sca 1* y *sca 2* pertenecen a una familia de proteínas de membrana externa denominada “autotransportadoras” las cuales son encontradas en bacterias Gram negativas (54). *OmpB* es una proteína que se encuentra presente en todas las especies del género *Rickettsia* y actúa como ligando para Ku70, una proteína quinasa localizada en citoplasma y membrana (15, 54, 55). Algunos estudios, principalmente realizados en rickettsias del grupo de las fiebres manchadas donde utilizaron como modelo a *R. conorii*, la interacción entre Ku70 – *OmpB* es suficiente para mediar la internalización en células no fagocíticas, por ejemplo, las células endoteliales, puesto que recluta a una ligasa de ubiquitina que es necesaria para conducir a un rearrreglo del citoesqueleto en el sitio de adhesión de la célula (55, 56) (Ver Figura 2). Una vez dentro de las células, las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas usan enzimas como la fosfolipasa C y la hemolisina C, codificadas por los genes *pld* y *thyC* respectivamente, que lisan la membrana del fagosoma antes de que se una con el lisosoma y rápidamente escapan al citoplasma de la célula donde adquiere nutrientes básicos como glutamato, aminoácidos, nucleótidos y ATP necesarios para su crecimiento mediante la secreción de factores como el T4SS (54). Adicionalmente, en el citoplasma la bacteria expresa la proteína *sca 2* o también llamada *RickA* que recluta al complejo Arp2/3 que se encarga de polimerizar los filamentos de actina y permitir su movimiento a lo largo de las células endoteliales adyacentes generando una vasculitis, así como influir en la entrada al núcleo donde se pueden dividir mediante fisión binaria (10, 54, 55). Este movimiento basado en la polimerización de la actina se da a una velocidad de 4.8  $\mu\text{m}/\text{minuto}$ , dicha diseminación rápida hace que las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas rara vez se acumulen en una misma célula, siguiendo un patrón de infección similar al usado por bacterias como *Shigella* y *Listeria* (10, 57).

Luego de que las células endoteliales han sido infectadas se producen grandes cantidades de citocinas pro – inflamatorias como IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, PDGF, M-CSF e ICAM-1. Existen dos citocinas que son bactericidas para las rickettsias, estas son el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  dado que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) aunque también favorezcan el daño endotelial (11, 54, 58).

**Figura 2:** Mecanismo de entrada de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas a las células endoteliales.



Posteriormente, se da inicio a la respuesta inmune adaptativa en donde hay un predominio de la respuesta mediada por LTh1, es decir, se produce una respuesta de tipo celular en donde hay un incremento en TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  producido por dichos linfocitos y células NK, así mismo se favorece la activación de LTCD8 citotóxicos necesarios para obtener una óptima respuesta inmune contra las rickettsias. Con respecto a la respuesta humoral o Th2, esta se genera por la presentación de antígenos provenientes de las proteínas OmpA y OmpB a los linfocitos B. Los anticuerpos producidos contra estos dos antígenos son muy importantes dado que generan una protección en casos de reinfección y contribuyen a la eliminación de las rickettsias en el periodo de convalecencia de la enfermedad (58). Sin embargo, también se producen anticuerpos contra antígenos timo independientes como el lipopolisacrido (LPS), estos anticuerpos son no protectores contra la infección y generan reacción cruzada entre rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (10).

### 3.4.1. Manifestaciones clínicas de la RMSF

La expansión de la vasculitis provocada por las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, en especial por *R. rickettsii*, conlleva a la generación de pequeñas hemorragias, aumento de la permeabilidad vascular, edema, activación de la cascada de la coagulación y de los mecanismos humorales de la inflamación (54). La extravasación de plasma a órganos vitales como el cerebro o los pulmones es de pésimo pronóstico dado que carecen de vasos linfáticos para remover el líquido intersticial. Por otro lado, las plaquetas se consumen localmente dado al estado procoagulante que se genera por la activación de la cascada de la coagulación, sin embargo, la coagulación intravascular diseminada (CID) es un fenómeno raro en los pacientes con rickettsiosis (15).

La RMSF presenta un periodo de incubación entre 2 – 14 días después de la mordedura de la garrapata con una media de 7 días. Es importante destacar que solamente un 40% de los pacientes recuerda haber sido picados por alguna garrapata. En la fase aguda se presentan síntomas inespecíficos como fiebre (>38°C), cefalea, malestar general, mialgias, artralgias, anorexia, vómito, fotofobia y astenia simulando una infección vírica (9). Durante los primeros 3 días la triada clásica de la enfermedad (fiebre, cefalea y rash) se suele observar en el 3% de los pacientes pero aumenta hasta un 60 – 70% en los días 7 – 10 después del comienzo de los síntomas (5). El rash o exantema inicia en las muñecas y tobillos como lesiones maculares eritematosas no pruriginosas las cuales se pueden diseminar alcanzando las extremidades y el tronco. En esta fase, el exantema suele ser maculopapular asociado a petequias aunque un 10% de los pacientes nunca lo desarrollan. El continuo daño del tejido y la piel causado por *R. rickettsii* puede resultar en una necrosis y gangrena en las extremidades requiriendo la amputación de las mismas. Adicionalmente, los pacientes con casos severos de RMSF pueden presentar manifestaciones cardíacas, gastrointestinales, pulmonares, oculares, renales y neurológicas (9). Las tasas de letalidad de esta enfermedad están entre el 23 – 85% en la era pre – antibiótica y del 5% con un tratamiento antibiótico adecuado (5, 9).

Uno de los mayores problemas clínicos de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas es que las manifestaciones en la fase temprana son similares a las de la influenza, dengue, fiebre amarilla, entre otros, y las presentaciones clásicas de la enfermedad (triada clínica) no son tan frecuentes (15). Estas enfermedades no se diagnostican, no solo por la carencia en tecnología para el análisis de laboratorio sino, también, por la ausencia de la sospecha clínica asociada a la falta de conocimiento del personal médico y la formulación de tratamiento empírico fuera del contexto médico (16). La ausencia de la sospecha clínica se debe, en parte, a la presentación no específica de la enfermedad. Además, la inexistencia de la erupción cutánea en muchos casos, la presencia de otros síntomas como vómito y diarrea, y la carencia de historia de exposición a las garrapatas contribuyen a que esta enfermedad sea poco conocida y por ende subdiagnosticada, motivo por el cual es importante determinar su incidencia en la población de áreas endémicas de Colombia.

### 3.5. Papel de los animales en la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas

En animales como los caninos, la RMSF es una enfermedad potencialmente fatal en especial si es causada por *R. rickettsii* en perros menores a 3 años (59). Al igual que en los humanos, estas bacterias tienen tropismo por las células endoteliales de pequeñas arterias y vénulas generando una vasculitis necrosante, además pueden aparecer síntomas neurológicos, descarga ocular bilateral, edema conjuntival, anorexia, fiebre y letargia que pueden conllevar a la muerte del animal en cuestión de días (59, 60). Dado que estos animales son susceptibles a esta enfermedad y son comúnmente parasitados por garrapatas como *R. sanguineus* y *A. cajennense* la determinación de la seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en estos animales contribuye a obtener información sobre las zonas de alto riesgo para poblaciones humanas (61). *Melo, et al*, 2011 (62) determinaron factores de riesgo asociados a la infección de caninos por parte de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, entre estos se encuentran: vivir en áreas rurales, ser utilizados para cacería y la infestación por *A. cajennense*. En el caso de equinos y bovinos con RMSF estos animales suelen presentar fiebre, pérdida de apetito, fatiga, abortos, bacteriemia por aproximadamente 1 semana y, en el caso de bovinos, disminución en la producción de leche. Sin embargo, es muy raro que la RMSF sea letal para estos animales (63, 64). *Sangioni et al*, 2005 (52) recalcan la importancia de los equinos en la transmisión de vectores infectados con rickettsias a otros mamíferos tales como caninos, bovinos y humanos. Además, los equinos son hospederos primarios para *A. cajennense* y son parasitados por todos los estadios de la garrapata, por ende, son muy útiles en el monitoreo de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.

Aunque la garrapata es considerada el principal reservorio para *R. rickettsii* dado que la puede transmitir de forma transovárica y transestadio, y debido a la capacidad patogénica de la bacteria que explica la baja prevalencia de garrapatas infectadas, se ha hecho necesario estimar la presencia de los llamados reservorios “amplificadores”. Estos “amplificadores” suelen ser mamíferos que son susceptibles a la infección por *R. rickettsii* y son susceptibles a la infestación por garrapatas implicadas en la transmisión de la bacteria ayudando así a su diseminación en zonas endémicas (11). *Labruna*, 2009 (12) describe cinco características que son necesarias para considerar a algún mamífero como amplificador. Estas características son:

1. Tiene que ser abundante en zonas donde *R. rickettsii* es endémico.
2. Tiene que ser un hospedero primario para la garrapata.
3. Tiene que ser susceptible a la infección por *R. rickettsii*.
4. Una vez infectado por *R. rickettsii* debe desarrollar una rickettsemia suficiente para infectar a otras garrapatas comensales.
5. Debe tener una alta tasa de reproducción que permita la disponibilidad casi permanente de un abundante número de animales susceptibles a la infección aguda.

En países como Estados Unidos, se ha identificado a *Microtus pennsylvanicus* como un amplificador eficiente para *R. rickettsii* ya que es abundante en las zonas endémicas para este microorganismo, adicionalmente, es un hospedero primario para *D. variabilis* y desarrolla una rickettsemia ente 6 – 8 días posterior a la

infección la cual es capaz de infectar al 100% de las garrapatas comensales. En Brasil, se han identificado dos animales que actúan como amplificadores, los chigüiros y las zarigüeyas. Estos animales son endémicos en estados como Sao Paulo y Minas Gerais, además son hospederos primarios para *A. cajennense* desarrollando una rickettsemia por varias semanas que es capaz de infectar entre el 20 – 25% de las formas inmaduras de la garrapata (12). En Colombia, aún no se han realizado estudios para identificar animales amplificadores en zonas endémicas.

### 3.6. Diagnóstico

#### 3.6.1. Serología

Los métodos serológicos son los más usados para el diagnóstico de rickettsiosis dada su facilidad. Actualmente la inmunofluorescencia indirecta (IFI) es aceptada como el método de referencia para el diagnóstico y se usa para evaluar títulos de IgM e IgG en sueros convalecientes (65). Para considerar que una persona ha tenido contacto con especies del género *Rickettsia* se tiene como punto de corte para IgG de 1:64, mientras que para IgM es de 1:32. IgM e IgG se pueden detectar 7 a 15 días después del comienzo de la enfermedad (65). Si el paciente sobrevive a la infección por rickettsias se genera una buena respuesta inmune que confiere protección de por vida, razón por la cual una sola medición de anticuerpos no proporciona ninguna información sobre el momento de la infección, por tal motivo es necesario realizar el análisis de dos muestras pareadas, es decir, una muestra de la fase aguda y otra de la fase convaleciente (después de 15 días y antes de dos meses), donde se esperaría encontrar un aumento de por lo menos 4 títulos para afirmar que si se cursa por una infección (66).

Si bien es cierto que la IFI es el *gold estándar*, hay un inconveniente en la interpretación de los resultados obtenidos mediante este método dado que existe una reactividad entre especies de *Rickettsia*, especialmente entre el grupo de las fiebres manchadas y en menor medida con rickettsias del grupo del tifus que se debe a los anticuerpos contra el LPS que se producen en la respuesta inmune humoral contra estos microorganismos, motivo por el cual la evaluación de un solo antígeno no permite una conclusión definitiva del agente causal (10, 65) En las últimas décadas se ha presentado un gran incremento de nuevas especies de rickettsias de patogenicidad desconocida, de las cuales la mayoría han sido aisladas de garrapatas, por ejemplo, *Rickettsia amblyommii*, la cual tiene reacción cruzada con especies del grupo de las fiebres manchadas (36). Para solucionar dicho inconveniente, el grupo especializado en rickettsias de Marsella (Francia) desarrolló un procedimiento estándar denominado inmunoabsorción cruzada asociado al Western Blot, en donde se evalúan varios antígenos y de esta forma determinar con mayor exactitud el patógeno implicado y evitar falsos positivos, sin embargo, esta técnica solamente se aplica en laboratorios de referencia ya que, a pesar de ser un procedimiento sencillo, es costoso y se requiere de cultivos de varias especies de *Rickettsia* para poder ser realizado (65, 66). Existen otras pruebas que permiten la detección de anticuerpos contra *Rickettsia* spp., por ejemplo, ELISA, fijación de complemento, aglutinación en latex, entre otras (67).

### 3.6.2. Cultivo

El aislamiento de la *Rickettsia* es de gran importancia dado que la última meta diagnóstica es recuperar el patógeno del vector o del paciente. Como estos microorganismos son estrictamente intracelulares al teñirlos con la técnica de Gimenez retienen la fucsina básica y se pueden visualizar. Las rickettsias pueden crecer *in vitro* en cultivos celulares (células Vero, L929, HEL, MRC5) los cuales deben ser manipulados en laboratorios con nivel 3 de bioseguridad. Estas bacterias pueden ser aisladas de muestras tales como sangre, biopsias de piel (escara de inoculación) y artrópodos como las garrapatas (3, 65).

### 3.6.3. Biología molecular

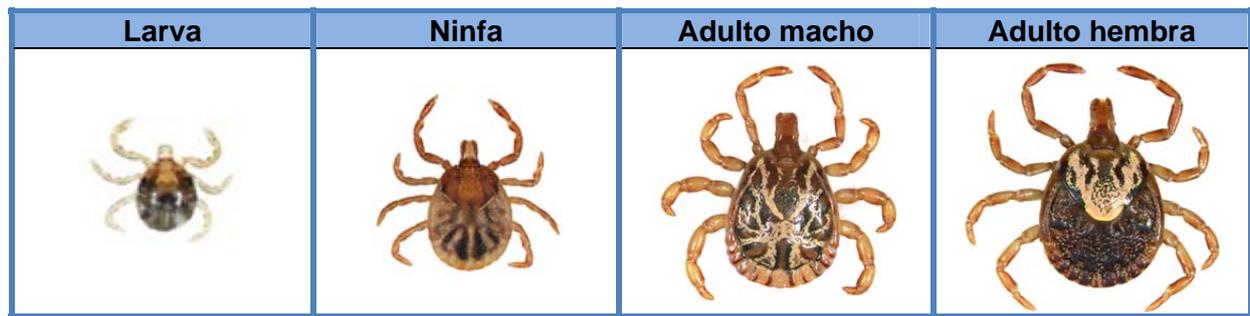
Los métodos moleculares basados en PCR tienen una sensibilidad y especificidad elevada permitiendo identificar rápidamente la presencia de la bacteria en sangre, biopsias de piel y las garrapatas ya que se buscan genes específicos para *Rickettsia* spp. (65). Santibañez *et al*, 2012 (68) evaluaron la eficiencia de los métodos de PCR que amplifican DNA de *Rickettsia* spp. a partir de muestras clínicas tales como sangre con EDTA, biopsias de piel y garrapatas de varios pacientes con rickettsiosis en fase aguda, ellos realizaron PCR sencillas (16s rRNA, *gltA* extremo 5' y *htrA*) y PCR secuenciales, es decir, anidadas o semianidadas para *OmpB*, *gltA* región central y *OmpA*, donde demostraron que estos métodos si son realmente útiles para el diagnóstico de rickettsiosis, especialmente las PCR secuenciales para *OmpB*, *gltA* y *OmpA*. Adicionalmente, indican que la PCR para *OmpB* es efectiva para la realización de un primer screening y permite detectar un gran porcentaje de muestras positivas, la PCR para *OmpA* es la más fiable para implicar a una especie de *Rickettsia* en patología humana. No obstante, la epidemiología, los síntomas clínicos y el vector deben ser valorados para el diagnóstico de la rickettsiosis.

### 3.7. Características de *Amblyomma cajennense*

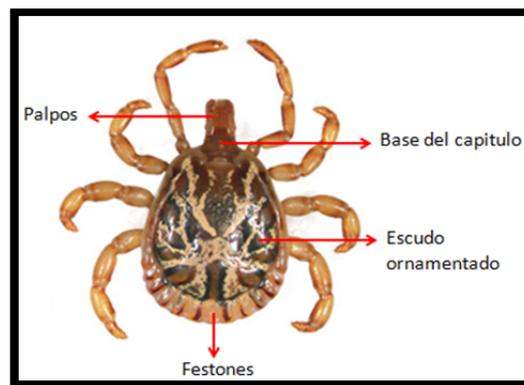
En Latinoamérica se han descrito 93 especies de garrapatas pertenecientes a la familia *Ixodidae*, el 55% (51 especies) de esta familia corresponde al género *Amblyomma*, el cual tiene gran importancia médica. Hay cuatro especies de *Amblyomma* (*A. cajennense*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale* y *A. triste*) que son reconocidas como vectores potenciales de enfermedades rickettsiales (29).

*A. cajennense* posee ciertas características morfológicas que son bastante útiles para su identificación mediante el uso de claves taxonómicas (Figura 3). Por ejemplo, esta especie tiene los palpos largos comparados con otras especies. El escudo es generalmente ornamentado, presentan ojos y festones. La base del capítulo es de forma variable, en general subtriangular o subrectangular dorsalmente. Las placas adanales están ausentes en el macho, pero son pequeñas las placas ventrales, pueden estar presentes en frente de los festones. Los escudos ventrales pueden estar presentes y extenderse más allá del margen posterior de los festones de los machos. Las placas estigmáticas son subtriangulares o en forma de coma (69). (Figura 4). Adicionalmente, Martins, *et al*, 2010 (70) realizaron nuevas claves taxonómicas para la identificación de estadios inmaduros de la garrapata facilitando aun mas su detección en hospederos mamíferos.

**Figura 3:** Estadios de *A. cajennense*



**Figura 4:** Morfología de *A. cajennense*



Aunque constantemente se desarrollan nuevas y sofisticadas herramientas para la detección, identificación y control de patógenos transmitidos por garrapatas, la biología, ecología y distribución de los vectores no está claramente definida. *A. cajennense* es una garrapata que, a pesar de su abundancia y actividad como vector de diversos patógenos humanos y animales, no tiene una caracterización ecológica completamente definida en varios países donde se ha visto involucrada en la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas como Colombia. Sin embargo, Brasil es el único país latinoamericano que ha realizado estudios sobre la dinámica estacional de esta garrapata (71, 72). Esta garrapata está geográficamente distribuida en el continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, además se ha encontrado en las islas del Caribe (Cuba, Antillas, Bahamas, Trinidad y Tobago, entre otras) (13).

*A. cajennense* es una garrapata de tres hospederos la cual infesta principalmente a equinos y chigüiros. Sin embargo, debido a su baja especificidad de hospedero, especialmente durante sus fases inmaduras, puede infestar adicionalmente a caninos, bovinos, aves, roedores pequeños y humanos (12, 13). Se ha descrito que este artrópodo actúa como vector de *Ehrlichia ruminantium*, patógeno responsable de la enfermedad de Heartwater en rumiantes de África. Adicionalmente, *A. cajennense* es el vector de *R. rickettsii*, *R. amblyommi*, entre otras, en Argentina, Brasil, Colombia, México, Panamá y Costa Rica (71).

### 3.7.1. Preferencias ecológicas de *Amblyomma cajennense*

En el sur de Estados Unidos y Centroamérica, se ha encontrado que *A. cajennense* tiene preferencia por dos áreas ecológicas bien definidas. Una de estas áreas se encuentra entre 0 – 1000 msnm, con una temperatura anual promedio de de 16°C (rango entre 13 – 26°C). La segunda área se encuentra entre 800 – 1500 msnm, con un rango de temperatura entre 13 – 24°C (71).

En Latinoamérica, Brasil es el único país que ha hecho estudios sobre la caracterización ecológica de esta garrapata. Szabo, *et al*, 2007 (72), indican que la máxima población de adultos se observa en el verano y la primavera (Marzo y Octubre respectivamente), las ninfas presentaron el pico más alto durante el invierno (Julio), mientras que las larvas tienen su pico más alto en otoño e invierno (Abril y Julio respectivamente), sin embargo, las larvas no suelen encontrarse durante la primavera o el verano.

Por otro lado, desde que se empezó a discutir el tema del cambio climático y su relación con la salud humana y animal, se ha afirmado que las enfermedades transmitidas por artrópodos son las más sensibles a este fenómeno. Se ha considerado que la respuesta de estos vectores a las variaciones en el clima no es lineal, por lo tanto, el incremento en la temperatura puede aumentar hasta diez veces la población de determinado artrópodo, por ejemplo, garrapatas del género *Amblyomma* y *Dermacentor* implicadas en la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (73). Este fenómeno conlleva a un aumento de las tasas de supervivencia y de la distribución de vectores lo cual aumenta su disponibilidad en determinadas zonas, induce una mayor duración e intensidad del patrón temporal de actividad del vector a través del año y finalmente un incremento de las tasas de desarrollo y reproducción del patógeno dentro del vector (74, 75).

Finalmente, en Colombia se ha considerado que la clasificación para la RMSF es de enfermedad desatendida aunque se considere de carácter emergente y/o re-emergente ya que el agente etiológico ha permanecido endémico en zonas donde nuevos casos se han registrado, por ejemplo, el municipio de Villeta (Cundinamarca) donde se ha confirmado la circulación de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas por medio de estudios serológicos y donde la convivencia con otros microorganismos causales de síndromes febriles agudos, como el dengue, hacen más probable el subdiagnóstico (76). Por tal motivo, es necesario evaluar la situación actual de esta zoonosis en Villeta y buscar especies del género *Rickettsia* en uno de sus vectores más implicados en Latinoamérica con el fin de contribuir al establecimiento de las características eco epidemiológicas de la enfermedad con el fin de implementar políticas de salud pública para disminuir la morbimortalidad de esta enfermedad infecciosa en el país.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar la presencia de anticuerpos de clase IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en muestras de suero de diferentes mamíferos y amplificación por la técnica de PCR de genes específicos para *Rickettsia* spp. a partir de muestras de garrapatas del municipio de Villeta, Cundinamarca.

### **4.2. Objetivos específicos**

**4.2.1.** Determinar la seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos, caninos y bovinos provenientes del municipio de Villeta.

**4.2.2.** Determinar la incidencia de casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en pacientes con síndromes febriles que ingresaron entre Enero 2012 y Enero 2013 al hospital de Villeta.

**4.2.3.** Determinar la tasa de infección mínima de *Rickettsia* spp. en muestras de *A. cajennense* recolectadas en el municipio de Villeta.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. Diseño del estudio**

El presente estudio es de carácter investigativo, de finalidad descriptiva y corte transversal para la detección de anticuerpos de isotipo IgG en suero de diferentes mamíferos y búsqueda de genes específicos de *Rickettsia* spp. en garrapatas de la especie *A. cajennense* recolectadas en el municipio de Villeta, Cundinamarca.

### **5.2. Área de estudio**

El área de estudio está localizada en Villeta, Cundinamarca, Colombia, (5°0'53"N, 74°28'29"W) el cual está ubicado sobre la cordillera Oriental y tiene una extensión de 114 Km<sup>2</sup>. Este municipio se encuentra a 862 msnm y tiene una temperatura promedio anual de 26°C con una humedad relativa entre 80 – 97%. De acuerdo a las proyecciones de población realizadas por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) se estimó que el total de la población en el año 2012 es de 24870 personas distribuidas en 22 veredas (9056) y 1 cabecera municipal (15814).

### **5.3. Población y muestra**

La población de estudio fueron muestras de suero de humanos, equinos, caninos y bovinos, así como garrapatas de la especie *A. cajennense* provenientes del municipio de Villeta, Cundinamarca, de un proyecto titulado “Caracterización de los factores climáticos y ecológicos de una especie de garrapata y su relación con la epidemiología de la rickettsiosis en un área endémica” en conjunto con la Universidad Nacional de Colombia y University of Texas Medical Branch.

#### **5.3.1. Recolección de sueros de equinos, caninos y bovinos**

En el municipio de Villeta se realizó un muestreo por conveniencia para obtener sueros de equinos, caninos y bovinos en el mes de Diciembre del 2011. Se obtuvo un total de 74 sueros de equinos, 118 sueros de caninos y 62 sueros de bovinos.

#### **5.3.2. Recolección de sueros de humanos**

Se recolectaron muestras de suero entre Enero del 2012 a Enero 2013 de pacientes que ingresaban al Hospital Salazar de Villeta con síndromes febriles agudos. Se utilizó como definición de caso probable todo paciente proveniente del municipio de Villeta con fiebre mayor o igual a 38°C, acompañado de cefalea, escalofrío, malestar general, mialgias, artralgias, mareo, astenia, anorexia, náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea y/o con dificultad respiratoria. A los pacientes que cumplían la definición de caso, en el momento de su ingreso (fase aguda) se les tomó una muestra de sangre, en tubo tapa roja para obtener el suero, y en un periodo después de 15 días y antes de 2 meses se les tomó una nueva muestra (fase convaleciente) con el fin de observar un aumento de títulos. Sin embargo, por diferentes razones, muchos pacientes no accedían a la segunda muestra, motivo

por el cual eran excluidos del estudio. Al final de este periodo se recolectaron un total de 91 sueros pareados.

### 5.3.3. Recolección de garrapatas (*A. cajennense*) del municipio de Villeta

Se decidió estudiar a *A. cajennense* dado que en resultados previos del proyecto titulado “*Caracterización de los factores climáticos y ecológicos de una especie de garrapata y su relación con la epidemiología de la rickettsiosis en un área endémica*”, en el cual está enmarcado este trabajo, se encontró una mayor prevalencia de *Rickettsia* spp. en esta garrapata en comparación de otras especies analizadas, por ejemplo, *R. sanguineus*, *Ixodes* spp, *Dermacentor nitens*, entre otras.

Actualmente, las garrapatas de la especie *A. cajennense*, provenientes del municipio de Villeta, se están recolectando mensualmente desde Octubre del 2012 hasta Octubre del 2013 con el fin de establecer la dinámica estacional de la misma y correlacionarlo con la epidemiología de la rickettsiosis en dicha zona endémica.

Las garrapatas que se analizaron fueron las recolectadas del mes de Octubre de 2012 ya que fue el mes en el que más pacientes ingresaron al hospital Salazar de Villeta por presentar síndromes febriles agudos. En total se recolectaron 1273 garrapatas de la especie *A. cajennense*.

### 5.3.4. Definición de variables

El estudio evaluó la prevalencia de anticuerpos IgG en muestras de diferentes mamíferos (equinos, caninos y bovinos), incidencia de casos de rickettsiosis en el periodo anteriormente mencionado y la tasa mínima de infección de *Rickettsia* spp en garrapatas provenientes del municipio de Villeta (Cundinamarca). De acuerdo a esto se definieron las siguientes variables relacionadas en las tablas 2 – 4.

**Tabla N° 2: Análisis de seroprevalencia en hospederos mamíferos**

Variable	Unidad de medición	Clasificación
<b>Dependiente:</b> Detección de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.	Títulos	Variable continua dependiente, cuantitativa
<b>Independiente:</b> Fuente de la muestra: Suero de equinos, caninos, y bovinos	Tipo de animal	Variable discreta independiente, cualitativa, nominal

**Tabla N° 3: Evaluación de la incidencia de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en pacientes con síndromes febriles en Villeta (Cundinamarca).**

Variable	Unidad de medición	Clasificación
<b>Dependiente:</b> Detección de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.	Títulos	Variable continua dependiente, cuantitativa
<b>Independiente:</b> Fuente de la muestra: Suero de humanos	Número	Variable discreta independiente, cualitativa

**Tabla N° 4: Determinación de la tasa mínima de infección de *Rickettsia* spp. en muestras de garrapata**

Variable	Unidad de medición	Clasificación
<b>Dependiente:</b> Presencia/ausencia de <i>Rickettsia</i> spp.	Presencia / Ausencia mediante PCR	Variable discreta, dependiente, cualitativa.
<b>Independiente:</b> Muestra: Pool's de garrapatas ( <i>Amblyomma cajennense</i> )	Número	Variable discreta, independiente, cualitativa.

#### 5.4. Procedimiento

##### 5.4.1. Titulación de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en sueros de hospederos mamíferos

Se realizó la titulación de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en sueros de hospederos mamíferos de acuerdo al protocolo descrito por *Walker, et al*, 1988 (77, 78) para la identificación de rickettsias mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Ver Anexo 1).

Se definió el título de trabajo de los conjugados Anti - Horse<sup>®</sup>, Anti – Dog<sup>®</sup>, Anti – Cow<sup>®</sup> y Anti – Human<sup>®</sup> (Jackson InmunoResearch). Para esto, se utilizaron laminas sensibilizadas utilizando como antígeno a *R. rickettsii* cepa Taiçu. En cada pozo de la lámina se colocó 20 µL de suero control positivo de equinos, caninos, bovinos y humanos, según corresponda. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del respectivo conjugado a partir de 1:50 hasta 1:1600 para definir el título en el cual se observaba una fluorescencia óptima para trabajar.

En el caso de la detección de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales se utilizó únicamente antígeno de *R. rickettsii* cepa Taiçu. Para la detección de los casos de esta rickettsiosis en humanos se utilizaron dos antígenos: *R. rickettsii* cepa Taiçu y *R. amblyommii*. Para ambos casos se estableció como punto de corte 1:64 y luego se determinó el título máximo mediante diluciones seriadas.

#### **5.4.2. Preparación de grupos (pools) de garrapatas**

A partir de las 1273 garrapatas de la especie *A. cajennense* se procedió a realizar los pools de trabajo correspondientes.

Debido a que las garrapatas son almacenadas en tubos de 1.5 mL, marca Eppendorf, con alcohol al 70%, antes de formar los pools se evaporó el alcohol colocándolas en baño María a 86°C por 20 minutos. Posteriormente se formaron los pools de trabajo teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- ✓ Deben ser del mismo hospedero.
- ✓ Deben ser de la misma especie.
- ✓ Deben ser del mismo estadio.

Una vez formados, se colocaron las garrapatas en tubos 1.5 mL, marca Eppendorf, con 40 µL de PBS (Buffer Fosfato Salino) 1X, los cuales se almacenaron a – 20°C hasta el momento de su procesamiento.

#### **5.4.3. Extracción y cuantificación de DNA**

A partir de los pools formados se realizó la extracción de DNA siguiendo las indicaciones del protocolo del estuche comercial DNeasy Blood and Tissue® de la marca Qiagen. Sin embargo, a este protocolo se le hizo una modificación ya que se sustituyó el “Tissue Lysis Buffer”, la proteinasa K y el “Binding Buffer” por la adición de DNAzol.

Luego de extraído el DNA se procedió a cuantificarlo mediante NanoDrop. El DNA fue conservado a – 20°C hasta el momento de su procesamiento. (Ver Anexo 2).

#### **5.4.4. PCR para la detección de *Rickettsia* spp.**

La amplificación de los genes 16sRNA de garrapata y *OmpB* se realizó usando primers y condiciones citadas por la literatura (Ver Tabla 5).

El gen 16sRNA de garrapata se usa como control de inhibición de PCR debido a que ciertos componentes intrínsecos de este artrópodo pueden llegar a inhibir la reacción, por ejemplo, la quitina, sangre, entre otros. Posteriormente, a los pools que fueron positivos se les realizó la amplificación de *OmpB* que corresponde al gen que codifica para la proteína de membrana del mismo nombre, la cual está presente en todas las especies del género *Rickettsia*.

**Tabla N° 5**

<b>PRIMERS USADOS</b>			
<b>Gen</b>	<b>Referencia</b>	<b>Primer Forward / Reverse</b>	<b>Tamaño esperado (pb)</b>
16sRNA	<i>Black, et al, 1994 (79)</i>	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	460 pb
		GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	
<i>OmpB</i>	<i>Roux, et al, 2000 (80)</i>	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	862 pb
		CCTTTTAGATTACCGCCTAA	

#### 5.4.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos de seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales se compararon con estudios realizados en años anteriores en la misma zona.

Para la determinación de la incidencia de esta rickettsiosis en humanos entre Enero 2012 y Enero 2013 se aplicó la siguiente fórmula:

$$Incidencia = \frac{\text{Numero de casos nuevos para rickettsiosis}}{\text{Total de la población de Villeta entre Enero 2012 – Enero 2013}} \times 10000$$

Adicionalmente, se tuvo en cuenta factores sociodemográficos tales como género, edad, zona de residencia (urbana o rural) para establecer asociaciones entre estos factores y la RMSF.

Por otro lado, ya que se formaron grupos o pools de trabajo y no se evaluaron las garrapatas individuales, se estimó la tasa de infección mínima (MIR) de *Rickettsia* spp. en garrapatas de la especie *A. cajennense* provenientes del municipio de Villeta mediante la siguiente fórmula:

$$MIR (\%) = \frac{\text{Numero de pools positivos}}{\text{Numero de garrapatas incluidas en todos los pools}} \times 100$$

El MIR indica que en los pools positivos para *Rickettsia* spp. hay al menos 1 garrapata infectada (81).

Finalmente, se obtuvieron datos de varios factores climáticos correspondientes al municipio de Villeta (Cundinamarca), los cuales fueron proporcionados por el IDEAM y los resultados parciales sobre la dinámica estacional de *A. cajennense* en los meses de Octubre del 2012 a Febrero del 2013 en dicho municipio, debido a que son los meses en los cuales ya se tienen clasificadas taxonómicamente las garrapatas, con el fin de relacionar las características y preferencias ecológicas de la garrapata con la epidemiología de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta (Cundinamarca).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos, caninos y bovinos provenientes del municipio de Villeta (Cundinamarca)

Inicialmente, se definió el título óptimo de trabajo para cada uno de los conjugados utilizados.

El título de trabajo del Anti - Horse<sup>®</sup> fue de 1:200, mientras que para el Anti – Dog<sup>®</sup> y Anti – Cow<sup>®</sup> fue de 1:1600, y el Anti – Human<sup>®</sup> fue de 1:400.

#### 6.1.1. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos

De un total de 74 sueros de equinos recolectados de 18 veredas y la cabecera municipal del municipio de Villeta, se detectaron títulos de IgG contra *R. rickettsii* en 25 (33.7%) muestras.

Adicionalmente, de las 25 muestras positivas 13 (52%) presentaron como título máximo 1:64, 8 (32%) presentaron como título máximo 1:128 y 1 (4%) para títulos de 1:256, 1:512, 1:4096 y 1:8192. (Ver Anexo 3).

#### 6.1.2. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en caninos

De un total de 118 sueros de caninos recolectados en las 22 veredas y la cabecera municipal del municipio de Villeta, se detectaron títulos de IgG contra *R. rickettsii* en 17 (14.4%) muestras.

De las 17 muestras positivas, 13 (76.4%) presentaron como título máximo 1:64, 1 (5.8%) para títulos de 1:512 y 1:4096, 2 (11.7%) presentaron como título máximo 1:8192. (Ver Anexo 4).

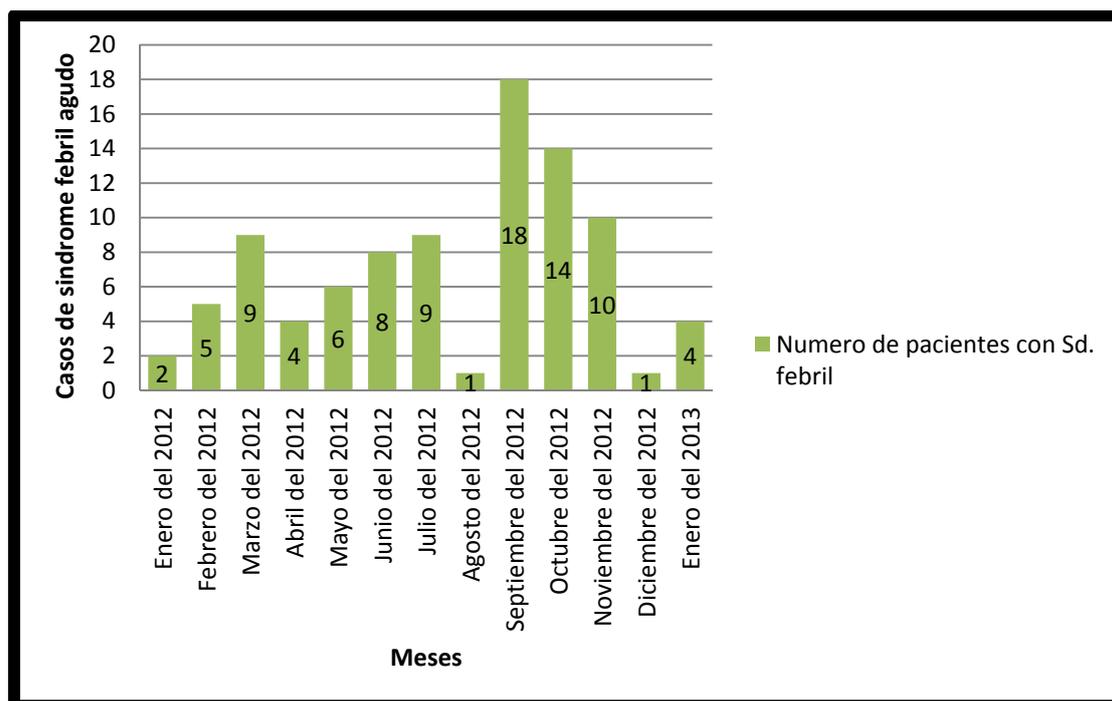
#### 6.1.3. Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en bovinos

De un total de 62 sueros de bovinos recolectados en 14 veredas del municipio de Villeta, se detectaron títulos contra *R. rickettsii* en 31 (50%) de las muestras.

De las 31 muestras positivas, 29 (93.5%) presentaron un título máximo de 1:64, 2 (6.4%) presentaron un título máximo de 1:128. (Ver Anexo 5).

## 6.2. Incidencia de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en humanos entre Enero del 2012 – Enero del 2013.

La incidencia de casos humanos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas fue determinada a partir de los pacientes que ingresaron al hospital Salazar de Villeta con cuadros febriles entre Enero del 2012 – Enero del 2013. En total se recibieron 302 pacientes en este periodo, pero solamente se recolectaron 91 sueros pareados (Ver Gráfica 1). El análisis para confirmar los casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas se determinó mediante IFI, donde los antígenos utilizados fueron *R. rickettsii* y *R. amblyommii*.



**Gráfica N° 1:** Casos con síndrome febril agudo que ingresaron al Hospital Salazar de Villeta entre Enero 2012 – Enero 2013.

De los 91 sueros recolectados, 46 (50.5%) correspondían a mujeres, 45 (49.5%) correspondían a hombres. La edad mínima fue de 5 meses, edad máxima fue 73 años, con una media de 20.4 años y una dispersión absoluta de 16.7 años. Con respecto a la zona de residencia, 64 pacientes (70.3%) vivían en áreas urbanas, 25 pacientes (27.5%) vivían en áreas rurales. De 2 (2.2%) pacientes no se obtuvo datos sobre su zona de residencia.

Los casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas fueron 14 (8 *R. rickettsii* y 6 *R. amblyommii*) (Ver Tabla 6).

La incidencia de esta rickettsiosis en el periodo anteriormente mencionado fue de 5.6 casos por cada 10000 habitantes en el periodo comprendido entre Enero del 2012 y Enero del 2013.

Tabla N° 6

<b>DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES SOCIODEMOGRÁFICOS</b>						
	<b>Total</b>		<b><i>R. rickettsii</i> &gt; 1:64</b>		<b><i>R. amblyommii</i> &gt; 1:64</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Todos	91	100	8	8.79	6	6.59
<b>Género</b>						
Femenino	46	50.5	7	15.2	3	6.5
Masculino	45	49.5	1	22.2	3	6.5
<b>Edad (años)</b>						
< 9	28	30.8	3	10.7	0	0
10 – 18	26	28.5	0	0	2	7.7
19 – 27	11	12.1	1	9.1	1	9.1
28 – 36	11	12.1	2	18.1	1	9.1
37 – 45	9	9.9	1	11.1	1	11.1
46 – 54	2	2.2	0	0	0	0
55 – 63	1	1.1	1	100	0	0
64 – 72	2	2.2	0	0	0	0
> 73	1	1.1	0	0	1	100
<b>Área de residencia</b>						
Urbana	64	70.3	7	11	3	4.7
Rural	25	27.5	1	4	2	8
No dato	2	2.2	0	0	1	50

Los títulos de IgG contra *R. rickettsii* y *R. amblyommii*, así como el género, la procedencia de los 14 casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas y la reactividad cruzada entre dichos antígenos se muestran a continuación (Ver Tabla 7).

Con respecto al periodo del año en el cual se presentaron los casos, 4 (Marzo), 2 (Mayo), 1 (Junio), 1 (Julio), 1 (Agosto), 1 (Septiembre), 3 (Octubre) y 1 (Noviembre).

Tabla N° 7

CASOS DE RICKETTSIOSIS DEL GRUPO DE LAS FIEBRES MANCHADAS							
Género	Procedencia	IFI <i>R. rickettsii</i>		IFI <i>R. amblyommii</i>		RC*	
		Fase aguda	Fase convaleciente	Fase aguda	Fase convaleciente	Si	No
Femenino	Área urbana	<1:64	1:128	1:128	1:256	X	
Femenino	Área urbana	<1:64	1:256	1:128	1:256	X	
Femenino	Área urbana	<1:64	1:128	<1:64	<1:64		X
Femenino	Área urbana	<1:64	1:128	1:64	1:128	X	
Femenino	Área urbana	<1:64	1:128	1:64	1:128	X	
Masculino	Área rural	<1:64	1:128	1:128	1:128	X	
Femenino	Área urbana	<1:64	1:128	<1:64	<1:64		X
Femenino	Área urbana	<1:64	1:128	<1:64	1:64	X	
Masculino	Área urbana	<1:64	<1:64	1:64	1:256		X
Femenino	Área urbana	<1:64	<1:64	<1:64	1:128		X
Masculino	Área rural	<1:64	<1:64	<1:64	1:128		X
Femenino	Área urbana	<1:64	<1:64	1:64	1:256		X
Femenino	No dato	<1:64	1:64	1:64	1:256	X	
Masculino	Área rural	<1:64	<1:64	<1:64	1:128		x

\*RC: Reactividad Cruzada

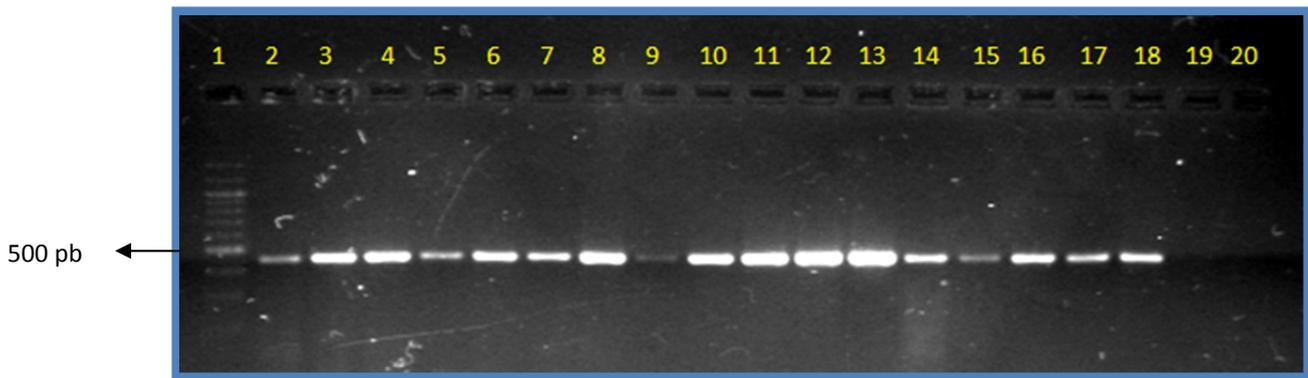
### 6.3. Detección molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas (*A. cajennense*) recolectadas del municipio de Villeta (Cundinamarca)

De los 133 pools analizados se encontró presencia del gen 16sRNA de garrapata en 111 (83.4%). El tamaño del producto amplificado es de 460 pb, como se observa en la figura 5.

Posteriormente, a estos 111 pools positivos para el gen 16sRNA de garrapata, se detectó la presencia del gen *OmpB* de *Rickettsia* spp en 18 pools. El tamaño del producto amplificado es de 862 pb, como se observa en la figura 6.

Finalmente, se determinó que la tasa mínima de infección en pools de *A. cajennense* fue del 5.9% (18/307) (Ver Tabla 8).

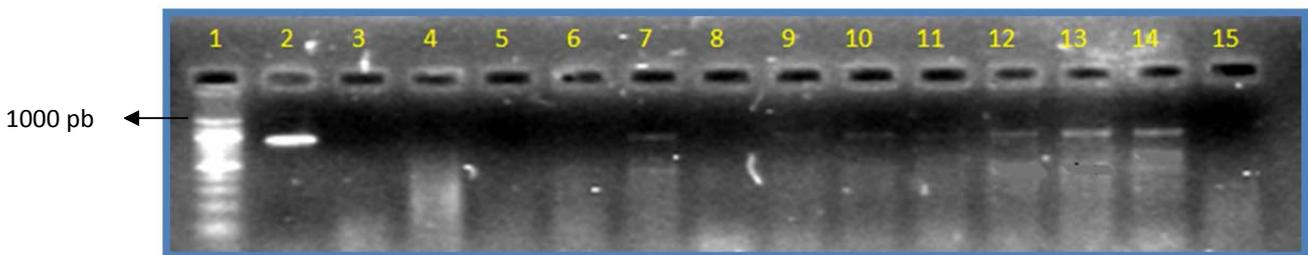
**Figura 5:** Amplificación del gen 16sRNA de garrapata.



Carril 1: Marcador de peso molecular Zymo<sup>®</sup> 100 pb.  
Carril 20: Control negativo.

En esta PCR no se usa control positivo dado que en todas las muestras se debería amplificar este gen.

**Figura 6:** Amplificación del gen OmpB de *Rickettsia* spp.



Carril 1: Marcador de peso molecular Zymo<sup>®</sup> 100 pb.  
Carril 2: Control positivo (DNA *Rickettsia rickettsii*)  
Carril 15: Control negativo.

Tabla N° 8

<b>POOLS DE GARRAPATAS (<i>A. cajennense</i>) POSITIVOS PARA <i>Rickettsia</i> spp.</b>					
Hospedero	Vereda	N° de pools realizados	N° de garrapatas por cada pool	N° de pools positivos	MIR* (%)
Bovino 1	Naranjal	5	5, 5, 5, 2, 2	1	5.2
Bovino 4	Naranjal	3	2, 2, 5	1	11.1
Bovino 5	Naranjal	5	5, 4, 4, 1, 2	1	6.25
Equino 1	Naranjal	18	5, 5, 5, 5, 3, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 1, 5, 5, 5, 3	9	10.8
Equino 1	Salitre Negro	18	5, 5, 5, 4, 5, 5, 3, 9, 5, 5, 5, 5, 5, 2, 4, 4, 4, 4	4	4.7
Equino 2	Salitre Negro	12	3, 2, 4, 5, 5, 5, 5, 4, 3, 2, 3, 3	1	2.3
Equino 3	Salitre Negro	13	7, 5, 5, 5, 5, 3, 5, 2, 3, 3, 3, 3, 3	1	1.9
<b>Total</b>		<b>74</b>	<b>307</b>	<b>18</b>	<b>5.9</b>

\*Tasa mínima de infección.

#### 6.4. Características y preferencias ecológicas de *A. cajennense* en el municipio de Villeta (Cundinamarca).

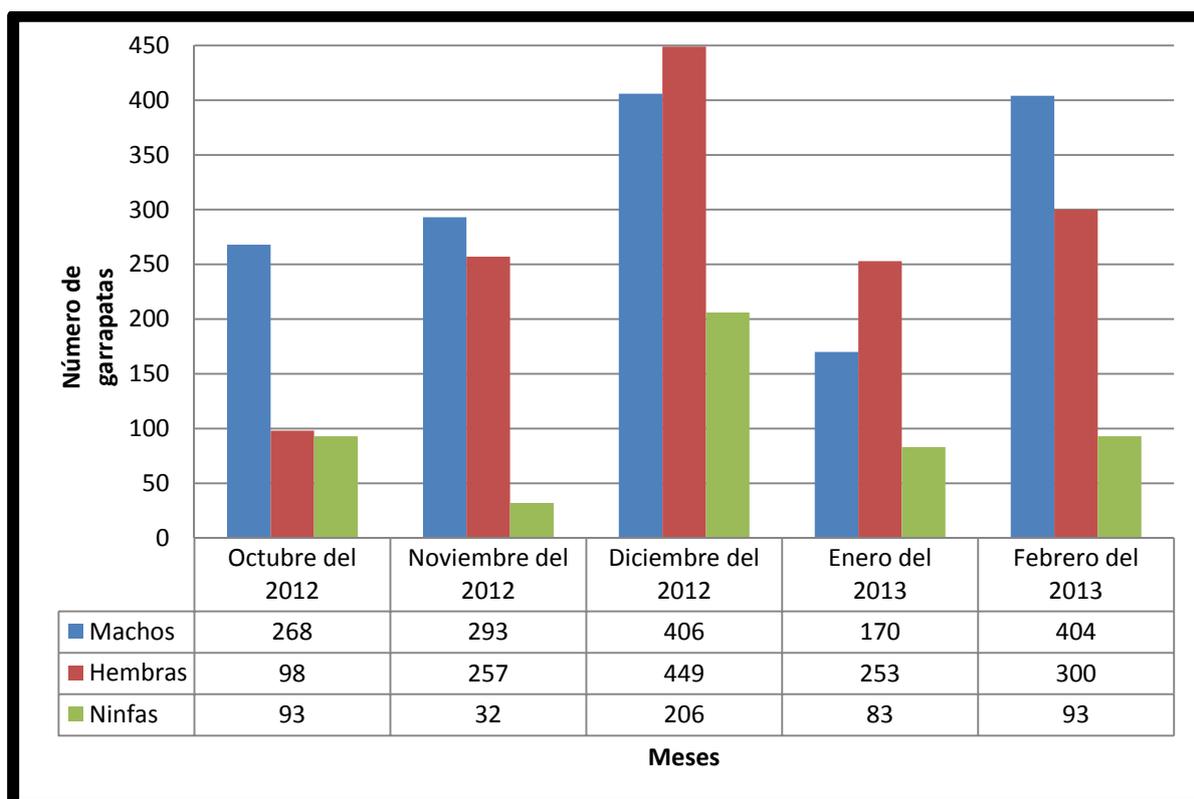
Con el fin de relacionar las características y preferencias ecológicas de *A. cajennense* con la epidemiología de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en esta área, se obtuvieron datos de varios factores climáticos tales como temperatura, porcentaje de humedad relativa<sup>2</sup> y brillo solar<sup>3</sup> del municipio de Villeta (Cundinamarca) con el fin de correlacionarlos con los resultados parciales de la dinámica estacional de esta garrapata en esta zona (Octubre del 2012 – Febrero del 2013).

En la gráfica N° 2, se puede observar como es la distribución estacional de *A. cajennense* en el municipio de Villeta, mientras que en las gráficas N° 3 – 5 se muestran los factores climáticos mencionados anteriormente correspondientes al año 2012.

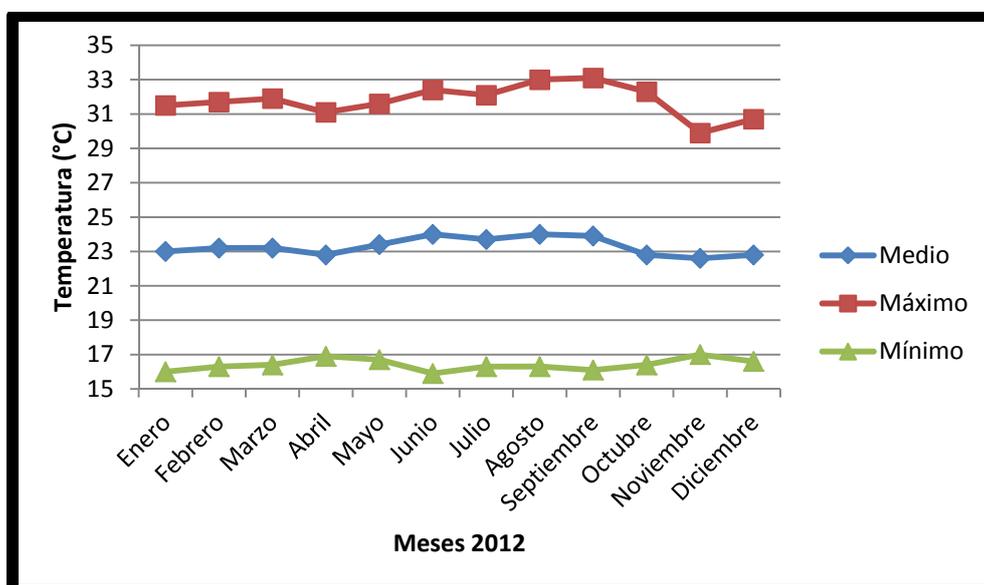
<sup>2</sup> Humedad relativa: Se define como la cantidad de vapor de agua contenida en el aire, en cualquier momento determinado. Esta se calcula teniendo en cuenta la masa de vapor de agua que realmente existe en la atmosfera y la masa que sería necesaria para saturarla a esa temperatura. Si la humedad relativa es muy elevada indica un ambiente muy húmedo, mientras que si es muy baja indica un ambiente seco (101).

<sup>3</sup> Brillo solar: Se define como la medición del tiempo en el cual un lugar ha recibido radiación directa, sin ser bloqueada por factores atmosféricos u otros obstáculos (102).

**Gráfica N° 2:** Distribución estacional de *A. cajennense* en el municipio de Villeta.

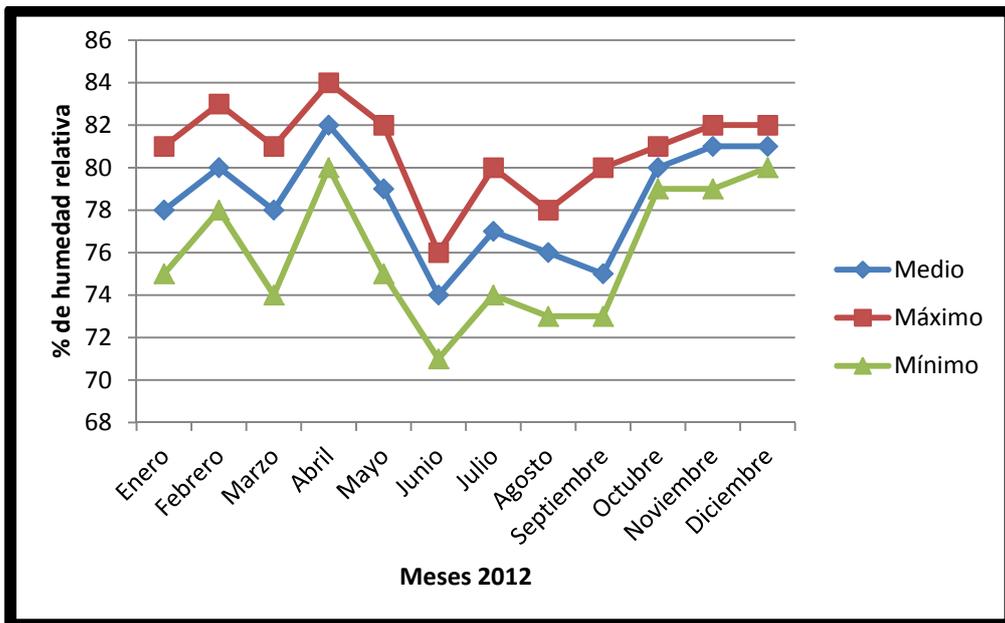


**Gráfica N° 3:** Temperatura (máxima, mínima, media) del municipio de Villeta en el año 2012



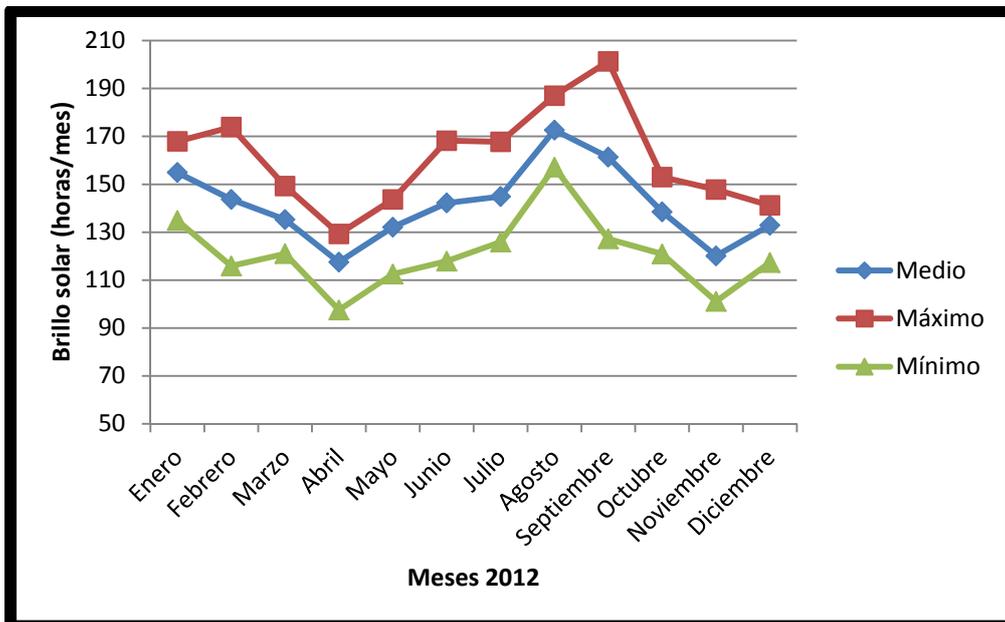
Fuente: IDEAM. 2012. Estación El trapiche. Villeta (Cundinamarca)

**Gráfica N° 4:** Porcentaje de humedad relativa en el municipio de Villeta en el año 2012



Fuente: IDEAM. 2012. Estación El trapiche. Villeta (Cundinamarca)

**Gráfica N° 5:** Brillo solar en el municipio de Villeta en el año 2012



Fuente: IDEAM. 2012. Estación El trapiche. Villeta (Cundinamarca)

## 7. DISCUSION

En el presente trabajo se confirmó que las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas hacen parte de los agentes etiológicos de síndromes febriles agudos en el municipio de Villeta (Cundinamarca). El análisis de seroprevalencia en animales mamíferos demostró la constante presencia de estos microorganismos en esta zona, además, la alta incidencia de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas encontrada en humanos se correlaciona con la tasa mínima de infección determinada en garrapatas de la especie *A. cajennense* recolectadas en esta área endémica, la cual es mayor a la reportada en Europa, Estados Unidos y Brasil (15, 82 – 85). Sin embargo, es importante resaltar que todavía no se poseen los resultados de la secuenciación realizada a los pools positivos para *OmpB* con el fin de establecer cuales especies del género *Rickettsia* spp. están infectado a dichas garrapatas.

Con respecto al análisis de seroprevalencia realizado en animales domésticos de Villeta, en este estudio se encontró una prevalencia de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (antígeno: *R. rickettsii*) en equinos, caninos y bovinos del 33.7%, 14.4% y 50%, respectivamente. De manera similar, *Hidalgo, et al*, 2009 (31) reportó una seroprevalencia en equinos y caninos del municipio de Villeta del 16.3% y 18.2%, respectivamente. Dada esta situación, no es posible afirmar que la seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales mamíferos de esta área aumentó ya que el número de animales evaluados en cada estudio no es comparable. Sin embargo, los hallazgos obtenidos en este trabajo demostraron la permanente circulación de estos microorganismos en esta área endémica. De manera similar, en Brasil, *Horta, et al*, 2004 (83) reportaron una seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos del 77.3% y en caninos del 31.3%.

Estos hallazgos tienen concordancia con lo descrito por *Sangioni, et al*, (52) y *Lemos, et al*, 1994, 1996 (84, 85), los cuales afirman que la seroprevalencia encontrada en equinos y caninos en zonas endémicas, donde *A. cajennense* es el principal vector, está caracterizada por una alta frecuencia de títulos de IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos, seguido por una baja frecuencia en caninos, esto se debe a que los caballos son hospederos primarios para esta garrapata aunque, en una menor frecuencia, todos los estadios madurativos pueden infestar a caninos e inclusive humanos, lo cual confirma que los equinos y caninos pueden ser usados como centinelas para la detección de RMSF en áreas endémicas, aun antes de la aparición de casos humanos (12, 14, 52).

Con respecto a los bovinos, en Latinoamérica, este es el primer estudio de seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas realizado en estos mamíferos donde se encontró una prevalencia de anticuerpos IgG contra bacterias de este grupo del 50%. Sin embargo, estudios realizados en varias islas del Caribe como Guadeloupe y St. Kitts and Nevis, han reportado una seroprevalencia de estos microorganismos, específicamente contra *R. africae*, del 81% en bovinos de esta zona (32, 33). En otro estudio realizado en Zimbabwe (África) se reportó una seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (antígeno: *R. conorii*) en bovinos del 90%, adicionalmente reportan que

la rickettsemia se pudo detectar hasta 32 días post – infección (34). Adicionalmente, son varios los estudios que han demostrado la presencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en garrapatas, de las especies *A. cajennense* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, recolectadas de bovinos (86). Todos estos hallazgos hacen evidente la exposición de estos mamíferos a rickettsias del grupo de las fiebres manchadas por lo que *Kelly, et al*, 1991 (34) sugieren que los bovinos pueden actuar como reservorios para estas bacterias debido a la rickettsemia que desarrollan por largos periodos, aunque, el verdadero papel de estos mamíferos en el ciclo de vida y epidemiología de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas aún no está totalmente establecido.

Por otro lado, se determinó la incidencia de casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta (Cundinamarca) en un periodo comprendido entre Enero del 2012 y Enero del 2013 la cual fue de 5.6 casos por cada 10.000 habitantes. Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado en la literatura, la incidencia obtenida es mayor a la descrita en varios países donde estas enfermedades son endémicas. Por ejemplo, en Estados Unidos, entre 1997 - 2002 se reportó una incidencia de 2.2 casos por cada millón de habitantes, pero esta se incrementó con el paso de los años (87). En el periodo comprendido entre 2004 – 2007 la incidencia fue de 6.8 casos por millón de habitantes dado que en los años 2004, 2005 y 2006 se reportó el mayor número de casos de RMSF en la historia de ese país (1713, 1936 y 2092, respectivamente) (9) y en el año 2008 fue de 8 casos por millón de habitantes (88). Sin embargo, es importante destacar que en determinadas zonas de Estados Unidos el número de casos por millón de habitantes es mayor que en otras, especialmente en la costa este del país, tal es el caso de Alabama (10.55), Virginia (8.93), Carolina del Norte (52.61) y Minnessota (21.0), cuyas incidencias son mayores que la incidencia promedio del país (89).

Adicionalmente, la incidencia de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas detectada en este trabajo es superior a la reportada por varios países europeos, donde la principal rickettsiosis de este grupo es la fiebre manchada del mediterraneo (MSF) causada por *R. conorii*. Por ejemplo, España (0.4 casos/ 100.000 habitantes) (90), Italia (1.6 casos/100.000 habitantes) (91), Bulgaria (10.91 casos/100.000 habitantes) (92) y Croacia (1.27 casos/100.000 habitantes) (93).

En Latinoamérica, Brasil es uno de los países en los que más casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas se reportan debido a que está bajo estricta vigilancia epidemiológica. En los estados de Sao Paulo y Minas Gerais se ha observado un claro resurgimiento de la enfermedad desde finales de la década de los 80 (5, 18). Según datos del ministerio de salud de Brasil (94), en el año 2011 se reportaron 65 casos de RMSF, de los cuales 39 corresponden al estado de Sao Paulo y 6 de Minas Gerais especialmente entre los meses de Mayo y Octubre. Cabe destacar, que en Brasil no se encontraron datos de incidencia acumulada dado que solamente reportan el número de casos pero no el total de población. No obstante, se puede inferir que la incidencia acumulada de esta zona es mucho menor a la encontrada en este trabajo ya que la población del estado de Sao Paulo y Minas Gerais es muy superior a la del municipio de Villeta.

Con respecto a Colombia, los resultados de incidencia acumulada de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta se correlacionan con

un estudio realizado por *Hidalgo, et al, 2007 (24)* en el cual indican que la prevalencia de IgG contra estos microorganismos en habitantes de este municipio fue del 40.3%, la cual es mayor a la reportada en Australia (1.4%), Indonesia (10.4%), Brasil (4.2%), Argentina (4%) y México (5%), de esta forma es indiscutible la continua exposición a garrapatas infectadas y por ende a rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en esta área con la consiguiente aparición de casos nuevos. Además, encontraron que la mayoría de las personas incluidas en el estudio afirmo haber tenido contacto con garrapatas, aunque no diferenciaron los estadios madurativos de las mismas.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta de los resultados obtenidos es la reactividad cruzada que se presentó, entre *R. rickettsii* y *R. amblyommii*, en 7 de los casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas. *R. amblyommii* es una especie perteneciente al grupo de las fiebres manchadas la cual fue descrita en 1974 en garrapatas *A. americanum* en Estados Unidos y posteriormente se demostró que más del 40% de estas garrapatas se encontraban infectadas con esta bacteria en regiones del sur y centro oeste del país (5). En un estudio realizado en Carolina del Norte (Estados Unidos) por *Apperson, et al, 2008 (95)* demostraron que pacientes con un diagnóstico presuntivo de RMSF presentaron seroconversión para *R. amblyommii* dado que los títulos fueron más altos que los obtenidos para *R. rickettsii*. Teniendo en cuenta estos antecedentes, hoy en día, se plantea la posibilidad de que esta especie pueda causar síndromes febriles de evolución benigna, que son falsamente diagnosticados como RMSF, teniendo en cuenta la reactividad cruzada entre especies que pertenecen a este grupo (5, 82). Estos hallazgos sugieren la importancia de implementar la inmunoabsorción cruzada y Western Blot para determinar con exactitud cuál es el agente etiológico involucrado en cuadros clínicos de rickettsiosis. Igualmente, cabe resaltar que *R. amblyommii* ha sido aislada de *A. cajennense*, *A. neumanii*, *A. longirostre*, *A. coelebs*, *D. nitens* en países como Estados Unidos, Argentina, Costa Rica, Brasil y Panamá (5, 96).

Según la distribución de los factores sociodemográficos de la incidencia acumulada obtenida, se observó que los casos de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas se presentaron en diferentes rangos de edad, pero con un pico en menores de 10 años y con un predominio del sexo femenino. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por *Dantas, 2007 (9)*, el cual reporta que en Estados Unidos se presenta una mayor incidencia en menores de 10 años con un pico entre 5 – 9 años, pero siendo más común en hombres que mujeres, sin embargo, esta discrepancia no es significativa.

Por último, el tercer objetivo de este trabajo fue determinar la tasa mínima de infección (MIR) de *Rickettsia* spp. en garrapatas de la especie *A. cajennense*. La MIR se debe calcular cuando la detección de genes específicos de *Rickettsia* spp. se realiza en pools o grupos de garrapatas, es decir, si un pool da positivo quiere decir que al menos una de las garrapatas contenidas estaba infectada (81). En el presente trabajo se determinó que la MIR en pools de *A. cajennense*, correspondientes al mes de Octubre del 2012, provenientes del municipio de Villeta (Cundinamarca), fue del 5.9%.

Esta tasa mínima de infección obtenida es mucho mayor a la descrita en Brasil por *Guedes, et al, 2005 (97)* en donde reportaron que la tasa mínima de infección en garrapatas de la especie *A. cajennense* recolectadas del estado Minas Gerais fue

del 1.28%. Adicionalmente, *Pinter, et al*, 2006 (98) reportaron una tasa de infección del 0.89% (6/669) en *A. aureolatum* del estado de Sao Paulo. Por el contrario, en Estados Unidos, *Burgdorfer*, 1988 (99) demostró que la tasa de infección de *R. rickettsii* en *D. variabilis* varía entre 0.05 – 1.3%. El resultado obtenido en este trabajo (5.9%) se relaciona directamente con la alta incidencia de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta en el periodo entre Enero 2012 – Enero 2013.

Por otro lado, al comparar los datos obtenidos de los factores climáticos y la distribución estacional de *A. cajennense* en el municipio de Villeta, se puede observar claramente que el pico de estadios adultos de esta garrapata se encuentran entre Octubre – Febrero, meses en los cuales la temperatura, la humedad relativa y el brillo solar son más altos (Ver Gráficas 2 – 5). Estos datos son muy similares a los reportados por *Labruna, et al*, 2002 (100) y *Szabo, et al*, 2007 (72) los cuales determinaron que la población de machos y hembras es mayor en los meses de primavera y verano, es decir, entre Octubre y Marzo, siendo mayor el número de machos que hembras, mientras que la población de larvas es mayor en Mayo y la de ninfas en los meses de Junio a Octubre que corresponden a meses de otoño e invierno, además determinaron que en un periodo de un año se obtiene una generación completa de esta garrapata.

En 2012 *Queirogas, et al*, (103) realizaron un estudio con el fin de establecer la relación entre aspectos ecológicos de *A. cajennense* y la epidemiología de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en el estado de Minas Gerais en Brasil. Ellos reportan que en zonas endémicas las mordeduras en humanos por parte de *A. cajennense* están más asociados a la presencia de estadios inmaduros de la garrapata, especialmente las ninfas, las cuales prevalecen en los meses de otoño e invierno, donde son más numerosas que los estadios adultos, lo que incrementa la probabilidad de contacto con los humanos. Además, otro factor que es importante tener en cuenta es que debido a su pequeño tamaño pasan inadvertidas durante el parasitismo, de esta forma se favorece la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el caso de que estén infectadas. Estos resultados obtenidos por estos autores son similares a los encontrados en este trabajo donde los picos de pacientes con síndromes febriles se presentan principalmente en los meses de Junio a Octubre, casualmente, los meses en los cuales se presume que la población de ninfas es mayor dado que a partir del mes de Octubre los estadios inmaduros disminuyen en número para dar paso a estadios adultos (Ver Gráfica 2). Estos datos también se correlacionan con datos obtenidos del ministerio de salud de Brasil, en los cuales la mayoría de casos de BSF se reportaron en los meses de Junio y Julio (104).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la permanente circulación de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta y por ende hacen parte de la etiología del síndrome febril agudo en esta zona, motivo por el cual, en el futuro este conocimiento deberá ser aplicado en el diseño de medidas con impacto en salud pública que contribuyan a controlar esta enfermedad infecciosa en áreas endémicas del país.

## 8. CONCLUSIONES

- ✓ Hay una permanente circulación de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta (Cundinamarca).
- ✓ Es el primer estudio de seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas realizado en bovinos.
- ✓ La incidencia de casos de rickettsiosis entre Enero del 2012 y Enero del 2013 encontrada en este trabajo, confirma la alta exposición por parte de los habitantes del municipio de Villeta (Cundinamarca) a vectores relacionados con la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchada
- ✓ Se determinó que la tasa mínima de infección en garrapatas de la especie *A. cajennense* es superior a la reportada en otros países como Brasil y Estados Unidos, lo que se relaciona con la alta incidencia de casos de rickettsiosis de grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta (Cundinamarca).

## 9. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda implementar técnicas como la inmunoabsorción cruzada y Western Blot para establecer el diagnóstico definitivo y agente causal de casos probables de rickettsiosis.
- ✓ Con respecto a la detección de genes específicos de *Rickettsia* spp. se recomienda estandarizar protocolos de PCR semianidada y anidada con el fin de tener más sensibilidad para la detección de estos patógenos en garrapatas.
- ✓ Se deben implementar políticas de salud pública con el fin de disminuir la exposición de los habitantes a vectores implicados en la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta (Cundinamarca).
- ✓ Es necesario realizar estudios multidisciplinarios (médicos, antropológicos, ecológicos, entomológicos, entre otros) para poder crear campañas de educación, prevención y control que contribuyan a disminuir la morbimortalidad asociada a rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el municipio de Villeta.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Labruna M, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal J, Dolz G, Abarca K, Romero L, de Sousa R, Oteo J, Zabala J. Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Revista MVZ Córdoba* 2011; **16** (2): 2435-2457.
2. Fuxelius H, Darby A, Min C, Cho N, Andersson S. The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. *Research in Microbiology* 2007; **158**: 745-753.
3. Raoult D, Parola P. *Rickettsial diseases*. Primera edición. Editorial Informa Healthcare. New York. 2007, 400p.
4. Renvoise A, Mediannikov O, Raoult D. Old and new tick – borne rickettsiosis. *International Health* 2009; **1**: 17-25.
5. Hidalgo M, Faccini A, Valbuena G. Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos, epidemiológicos y retos en el diagnóstico. *Biomedica* 2013; **33**: suplemento 1.
6. Telford III S, Goethert H. Emerging tick – borne infections: rediscovered and better characterized, or truly “new”? *Parasitology* 2004; **129**: 301-237.
7. Ricketts H. A microorganism which has a specific relationship to Rocky Mountain Spotted Fever. *Journal of the American Medical Association* 1909; **52**: 379-380.
8. Ricketts H. A summary of investigations of nature and means of transmission of Rocky Mountain Spotted Fever. *Contributions to Medical Science by Howard Taylor Ricketts*. Chicago University Press 1911: 278-372.
9. Dantas, F. Rocky Mountain Spotted Fever. *Lancet Infectious Diseases* 2007; **7**: 721-732.
10. Chen L, Sexton D. What's new in Rocky Mountain Spotted Fever?. *Infectious Disease Clinics of North America* 2008; **22**: 415-432.
11. Quintero J, Hidalgo M, Rodas J. Rickettsiosis: Una enfermedad letal emergente y re – emergente en Colombia. *Universitas Scientarum* 2012; **17** (1): 82-99.
12. Labruna M. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of New York Academy of Sciences* 2009; **1166**: 156-166.
13. Oliveira P, Borges L, Lopes C, Leite R. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2000; **92**: 295-301.
14. Schmidt P. Companion animal as sentinels for public health. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2009; **39**: 241-250
15. Diaz J, Cataño J. Fiebre manchada de las montañas rocosas: ni tan manchada ni tan montañosa como pensábamos. *Infectio* 2010; **14** (4): 264-276
16. Valbuena G. Fiebres que no deberían matar. *Biomedica* 2007; **27** (3): 321-324.
17. Sexton D, Kaye K. Rocky Mountain Spotted Fever. *Medical Clinics of North America* 2002; **86** (2): 351-359.
18. Angerami R, Resende M, Feltrin A, Katz D, Nascimento E, Stucchi R, Silva L. Brazilian Spotted Fever: A case series from an endemic area in Southeastern Brazil. *Annals of New York Academy of Sciences* 2006; **1078**: 170-172.
19. CDC. Summary of notifiable diseases – United States 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2011; **58**: 1-104.
20. Del Fiol F, Junqueira F, da Rocha C, Toledo M, Barberato S. A febre maculosa no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Publica* 2010; **27** (6): 461-466.
21. Eremeeva M, Klemt R, Santucci L, Silverman D, Dasch G. Genetic analysis of isolates of *Rickettsia rickettsii* that differ in virulence. *Annals of New York Academy of Sciences* 2003; **990**: 717-722.
22. Patiño L, Afanador A, Paul H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1937; **17** (5): 639-653.
23. Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, Keng C, Small M, Olano J, Bouyer D, Castañeda E, Walker D, Valbuena G. Rocky Mountain Spotted Fever, Colombia. *Emerging Infectious Diseases* 2007; **13** (7): 1058-1060.

24. Hidalgo M, Sanchez R, Orejuela L, Hernandez J, Walker D, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group Rickettsiae in a rural area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; **77** (2): 378-380.
25. Quintero J, Londoño A, Diaz F, Agudelo P, Arboleda M, Rodas J. Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noreste de Antioquía, Colombia. *Biomedica* 2013; **33**: Supl. 1
26. Acosta J, Urquijo L, Diaz A, Sepulveda M, Mantilla M, Heredia D, Gonzalez M, Parra E, Rey G, Munera G, Hidalgo M, Castañeda E, Segura O, Bolivar J, Galeano A, Giraldo M, Rodriguez E, Cedeño N, Perez C, Bayard V, Hernandez I, Villalobos R. Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero – marzo, 2006. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* 2006; **11** (12): 177-192.
27. Hidalgo M, Miranda J, Heredia D, Zambrano P, Vesga J, Lizarazo D, Mattar S, Valbuena G. Outbreak of Rocky Mountain Spotted Fever in Cordoba, Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 2011; **106** (1): 117-118.
28. Hidalgo M, Lizarazo D, Ovalle M, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, Mantilla G, Parra E, Porrás A, Vera M, Munera G, Carrillo P, Orejuela L, Valbuena G. Brote de Rickettsiosis en Las Córdobas, departamento de Córdoba, febrero – marzo 2007. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional* 2007; **12** (24): 367-378.
29. Abarca K, Lopez J, Acosta G, Lepe P, Soares J, Labruna M. A Third *Amblyomma* Species and the First Tick-Borne Rickettsia in Chile. *Journal of Medical Entomology* 2012; **49** (1): 219-222.
30. Guglielmone A, Beati L, Barros M, Labruna M, Venzal J, Szabo M, Martins J, Gonzalez G, Peña A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology* 2006; **40**: 83-100.
31. Hidalgo M, Vesga J, Lizarazo D, Valbuena G. Short report: A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; **80** (6): 1029-1030.
32. Parola P, Vestris G, Martinez D, Brochier B, Roux V, Raoult D. Tick borne rickettsiosis in Guadeloupe, the French West Indies: Isolation of *Rickettsia africae* from *Amblyomma variegatum* ticks and serosurvey in humans, cattle and goats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; **60** (6): 888-893.
33. Kelly P, Fournier P, Parola P, Raoult D. A survey for Spotted Fever Group Rickettsiae and Ehrlichiae from St. Kitts and Nevis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2003; **69** (1): 58-59.
34. Kelly P, Mason P, Manning T, Slater S. Role of cattle in the epidemiology of tick – bite fever in Zimbabwe. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; **29** (2): 256-259.
35. Olano J. Rickettsial infections. *Annals of New York Academy of Sciences* 2005; **1063**: 187-196.
36. Labruna M, Whitworth T, Bouyer D. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 2004; **41**: 1073-1081.
37. Labruna M, Whitworth T, Horta M, Bouyer D, McBride J, Pinter A, Popov V, Gennari S, Walker D. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**: 90-98.
38. Ogrzewalska M, Literak I, Cardenas J, Capek M, Labruna M. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. *Ticks and Tick – Borne Diseases* 2012; **3**: 254-256.
39. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick and flea born rickettsial emerging zoonoses. *Veterinary Research* 2005; **36**: 469-492.
40. Jado I, Oteo J, Aldamiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun M, García C, Rodriguez I, Anda P. *Rickettsia monacensis* and human disease. *Emerging Infectious Diseases* 2007; **13** (9): 1405-1407.

41. Dantas F, Chomel B, Otranto D. Ticks and tick – borne diseases: A one health perspective. *Trends in Parasitology* 2008; **28** (10): 437-446.
42. Guglielmone A, Robbins R, Apanaskevich D, Petney T, Estrada A, Horak I, Shao R, Barker S. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world. A list of valid species names. *Zootaxa* 2010; **2528**: 1-28.
43. Parra M, Pelaez L, Segura F, Arcos J, Londoño J, Diaz E, Vanegas M. *Manejo integrado de garrapatas en bovinos*. Primera edición. Corpoica. Ibagué. 1999. 80p.
44. Demma L, Traeger M, Nicholson W, Paddock C, Blau D, Eremeeva M, Dash G, Levin M, Singleton J, Zaki S, Cheek J, Swerdlow D, McQuiston J. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected vector in Arizona. *New England Journal of Medicine* 2005; **353** (6): 587-594.
45. Baldrige G, Kurtti T, Burkhardt N, Baldrige A, Nelson C, Oliva A, Munderloh U. Infection of *Ixodes scapularis* ticks with *Rickettsia monacensis* expressing green fluorescent protein: A model system. *Journal of Invertebrate Pathology* 2007; **94**: 163-174.
46. Niebylski M, Peacock M, Schwan T. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **65** (2): 773-778.
47. Macaluso K, Sonenshine D, Ceraul S, Azad A. Infection and transovarial transmission of Rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2001; **1** (1): 45-53.
48. Burgdorfer W, Friedhoff K, Lancaster J. Natural history of tick – borne spotted fever in the USA. *Bulletin of the World Health Organization* 1966; **35**: 149-153.
49. Burgdorfer W, Brinton L. Mechanism of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1975; **266** (1): 61-72.
50. Walker D, Paddock C, Dumler S. Emerging and re – emerging tick transmitted rickettsial and ehrlichial infections. *Medical Clinics of North America* 2008; **92**: 1345-1361.
51. Socolovschi C, Reynaud P, Kernif T, Raoult D, Parola P. Rickettsiae of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks and Tick – Borne Diseases* 2012; **3**: 354-359.
52. Sangioni L, Horta M, Vianna M, Gennari S, Soares R, Galvao M, Schumaker T, Ferreria F, Vidotto O, Labruna M. Rickettsial infection in animals and brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases* 2005; **11** (2): 265-270.
53. Azad A, Beard C. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases* 1998; **4** (2): 179-186.
54. Mansueto P, Vitale G, Cascio A, Seidita A, Pepe I, Carrocio A, Di Rosa S, Battista G, Cillari E, Walker D. New insight into immunity and immunopathology of rickettsial diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1-26.
55. Walker D, Valbuena G, Olano J. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Annals of New York Academy of Sciences* 2003; **990**: 1-11.
56. Uchiyama T, Kawano H, Kusuhara Y. The mayor outer membrane protein rOmpB of spotted fever rickettsiae functions in the rickettsial adherence to and invasion of Vero cells. *Microbes and Infection* 2006; **8**: 801-809.
57. Heinzen R. Rickettsial actin based motility: behavior and involvement of cytoskeletal regulators. *Annals of New York Academy of Sciences* 2003; **990**: 535-547.
58. Valbuena G, Feng H, Walker D. Mechanism of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes and Infection* 2002; **4**: 625-633.
59. Shaw S, Day M, Birtles R, Breitschwerdt R. Tick borne infectious diseases in dogs. *Trends in Parasitology* 2001; **17** (2): 74-80.
60. Chomel B. Tick borne infectious in dogs: An emerging infectious threat. *Veterinary Parasitology* 2011; **179**: 294-301.

61. McQuinston H, Guerra M, Watts M, Lawaczeck E, Levy C, Nicholson W, Adjemian J, Swerdlow D. Evidence of exposure to spotted fever group rickettsiae among Arizona dogs outside a previously documented outbreak area. *Zoonoses and Public Health* 2011; **58**: 85-92.
62. Melo A, Martins T, Horta M, Moraes J, Pacheco R, Labruna M, Aguiar D. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks and Tick Borne Diseases* 2011; **2**: 213-218.
63. Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan S, Foley J. Tick and ticks borne diseases in Guatemalan cattle and horses. *Veterinary Parasitology* 2005; **131**: 119-127.
64. Alessandra T, Santo C. Tick borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research* 2012; **106**: 6-11.
65. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles R, Bjoersdorff A, Blanco R, Caruso G, Cinco M, Fournier P, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Furlan S, Maurin M, Oteo J, Parola P, Perez C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; **10**: 1108-1132.
66. Mouffok N, Parola P, Lepidi H, Raoult D. Mediterranean spotted fever in Algeria: New trends. *International Journal of Infectious Diseases* 2009; **13**: 227-235.
67. Kantso B, Svendsen C, Jorgesen S, Krogfelt K. Evaluation of serological test for the diagnosis of rickettsiosis in Denmark. *Journal of Microbiological Methods* 2009; **76**: 285-288.
68. Santibañez S, Portillo A, Santibañez P, Palomar A, Oteo J. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2012, Article in Press.
69. Quiroz H. *Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Séptima edición. Editorial Limusa. 1984. México. 876 p.
70. Martins T, Onofrio V, Barros D, Labruna M. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2010; **1**: 75-99.
71. Peña A, Guglielmone A, Mangold A. The distribution and ecological "preferences" of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2004; **98** (3): 283-292.
72. Szabo M, Castro M, Ramos H, Garcia M, Castagnolli K, Pinter A, Veronez V, Magalhaes G, Duarte M, Labruna M. Species diversity and seasonality of free living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 2007; **143**: 147-154.
73. Randolph S. To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases?. *Veterinary Parasitology* 2010; **167**: 92-94.
74. Betancourt J. Vectores y cambio climático. *Biomedica* 2011; **31** (supl): 11-73.
75. Gage K, Burkot T, Eisen R, Hayes E. Climate and vector borne diseases. *American Journal of Preventive Medicine* 2008; **35** (5): 436-450.
76. Hidalgo M. Panorama de las enfermedades ocasionadas por rickettsias en Colombia. III Congreso Latinoamericano de Enfermedades Rickettsiales. *Biomedica* 2011; **31** (Supl): 11-73.
77. Walker D. Diagnosis of rickettsial infections. *Pathology Annual* 1988; **23** (2): 69-96.
78. Walker D, Burday M, Folds J. Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *Southern Medical Journal* 1980; **73**: 1443-1446.
79. Black W, Piesman J. Phylogeny of hard and soft tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16sRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; **91**: 10034-10038.

80. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer membrane protein (rOmpB). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; **50**: 1449-1455.
81. Speck S, Perseke L, Petney T, Skuballa J, Pfaffle M, Taraschewski H, Bunnell T, Essbauer S, Dobler G. Detection of *Rickettsia helvetica* in ticks collected from European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*, Linnaeus, 1758). *Ticks and Tick – Borne Diseases* 2013; **4**: 222-226.
82. Parola P, Labruna M, Raoult D. Tick – borne rickettsiosis in America: unanswered questions and emerging diseases. *Current Infectious Diseases Reports* 2009; **11**: 40-50.
83. Horta M, Labruna M, Sangioni L, Vianna M, Gennari S, Galvao M, Mafra C, Vidotto O, Schumaker T, Walker D. 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; **71** (1): 93-97.
84. Lemos E, Machado R, Coura J. Rocky Mountain Spotted Fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 1994; **89** (4): 497-501.
85. Lemos E, Machado R, Coura J, Guimaraes M, 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. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 1996; **38** (6): 427-430.
86. Bermudez S, Eremeeva M, Karpathy S, Samudio F, Zambrano M, Zalvidar Y, Motta J, Dasch G. Detection and identification of Rickettsial agents in ticks from domestic mammals in Eastern Panama. *Journal of Medical Entomology* 2009; **46** (4): 856-861.
87. Chapman A, Murphy S, Demma L, Holman R, Curns A, McQuinston J, Krebs J, Swerdlow D. Rocky Mountain Spotted Fever in the United States: 1997 – 2002. *Annals of New York Academy of Sciences* 2006; **1078**: 154-155.
88. Lin L, Decker C. Rocky Mountain Spotted Fever. *Disease a Month* 2012; **58**: 361-369.
89. Openshaw J, Swerdlow D, Holman R, Krebs J, Mandel E, Harvey A, Harbeling D, Massung R, McQuinston J. Rocky Mountain Spotted Fever in United States, 2000 – 2007: Interpreting Contemporary Increases in Incidence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; **83** (1): 174-182.
90. Guerrero A, Gimeno F, Colomina J, Molina M, Oteo J, Cuenca M. Low incidence of tick borne rickettsiosis in a Spanish Mediterranean area. *Annals of New York Academy of Sciences* 2006; **1078**: 200-202.
91. Ciceroni L, Pinto A, Ciarrocchi S, Ciervo A. Current knowledge of rickettsial diseases in Italy. *Annals of New York Academy of Sciences* 2006; **1078**: 143-149.
92. Baltadzhiev I, Popivanova N. Some epidemiological features of the Mediterranean Spotted Fever re – emerging in Bulgaria. *Folia Medica* 2012; **54** (1): 36-43.
93. Polic V, Luksic B, Capkun V. Epidemiological features of Mediterranean Spotted Fever, Murine Typhus and Q fever in Split – Dalmatia country (Croatia), 1982 – 2002. *Epidemiology and Infection* 2008; **136** (7): 972-979.
94. Ministerio de Salud de Brasil. [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1555](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555). Consultado el 16 de Mayo del 2013.
95. Apperson C, Engber B, Nicholson W, Mead D, Engel J, Yabsley M, Dail K, Johnson J, Watson D. Tick – borne disease in North Carolina: Is *Rickettsia amblyommii* a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain Spotted Fever?. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2008; **8** (5): 597-606.
96. Bermudez S, Zaldivar A, Spolidorio M, Moraes J, Miranda R, Caballero C, Mendoza Y, Labruna M. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Anton, Coclé, Panama. *Veterinary Parasitology* 2011; **177**: 134-138.

97. Guedes E, Leite R, Prata M, Pacheco R, Walker D, Labruna M. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian Spotted Fever endemic area in the state of Minas Gerais. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 2005; **100** (8): 841-845.
98. Pinter A, Labruna M. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Annals of New York Academy of Sciences* 2006; **1078**: 523-530.
99. Burgdorfer W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain Spotted Fever and Scrub Typhus. *Biology of Rickettsial Diseases* 1988; **1**: 33-50.
100. Labruna M, Kasai N, Ferreira F, Faccini J, Gennari S. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2002; **105**: 65-77.
101. McBain A. *Propiedades mecánicas y térmicas de los materiales*. Primera edición. Editorial Reverte. Barcelona. 1977. 319p
102. Instituto Meteorológico Nacional. Series de brillo solar en Costa Rica. [http://www.imn.ac.cr/publicaciones/brillo\\_solar\\_resumen.pdf](http://www.imn.ac.cr/publicaciones/brillo_solar_resumen.pdf). Consultado el 17 de Mayo del 2013.
103. Queirogas V, Del Claro K, Nascimento A, Szabo M. Capybaras and ticks in the urbana reas of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick – borne diseases. *Experimental and Applied Acarology* 2012; **57**: 75-82.
104. Ministerio de salud de Brasil. Fiebre Maculosa Brasileira. [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1555](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555). Consultado el 17 de Mayo del 2013.

## Anexo 1.

### Imunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra *Rickettsias*

#### Fundamento

La inmunofluorescencia es un método de detección de antígenos o anticuerpos mediante el uso de sustancias fluorescentes. En el presente caso, se pretende la detección de anticuerpos reactivos contra antígenos de *Rickettsia* en suero, lo que indica una exposición previa del individuo a esta bacteria.

#### Condiciones de bioseguridad

El manejo de muestras de sueros humanos requiere las precauciones recomendadas para el manejo de muestras potencialmente contaminantes.

Utilice las medidas de protección necesarias, como son: batas de laboratorio, guantes, etc.

#### Materiales

Láminas portaobjeto con antígeno o placas

#### Procedimientos

1. Retire el número requerido de placas del refrigerador y sumérgalas en PBS por 10min a temperatura ambiente.
2. Retire las placas del PBS y transfíralas a la solución de bloqueo. Permita que las placas se empapen por 15min a temperatura ambiente.
3. Remueva las placas de la solución de bloqueo y permita que se sequen.
4. Prepare diluciones 1:64 de los controles positivo y negativo, y de las muestras a evaluar.
5. Distribuya las muestras diluidas y los controles, en los pozos apropiados de las placas.
6. Incube las placas en una cámara húmeda a 37°C por 30min.
7. Retire las placas de la cámara húmeda y enjuáguelas suavemente con buffer de lavado. No permita que el chorro caiga directamente sobre los pozos. Evite la mezcla de las muestras.
8. Lave las placas sumergiéndolas en buffer de lavado por 10min. Repita el lavado con buffer de lavado fresco por otros 10min.
9. Retire las placas y déjelas secar.
10. Prepare la dilución correspondiente del conjugado (Anti-Human, Anti –Horse, Anti-Dog, Anti-Cow).
11. Distribuya el conjugado en los pozos apropiados de las placas.
12. Incube las placas en una cámara húmeda a 37°C por 30min.
13. Repita el lavado (paso 8), añadiendo 1-2 gotas de azul de Evans al buffer de lavado, antes de sumergir las placas.

14. Remueva las placas del buffer de lavado, séquelas con papel toalla. Agregue 2-3 gotas de solución de montaje, y aplique cubreobjetos.
15. Almacene las láminas lejos de la luz a 2-8°C hasta el momento de la lectura. Las láminas deben ser leídas el mismo día que son procesadas, pero pueden ser leídas al día siguiente sin que haya pérdida de la fluorescencia, siempre que hayan sido almacenadas en la oscuridad y a 4°C.

### **Preparación de los reactivos**

Las placas deben ser almacenadas a -20°C o menos, en un contenedor seco. Las placas pueden ser guardadas hasta por 1 año.

#### **PBS 10X:**

- 80g NaCl
  - 2g KCl
  - 11,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
  - 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - Disolver en 1 litro de agua destilada.
- Disolver 1:10 en agua destilada, para su uso.

#### **Solución de bloqueo (PBS con 1% BSA, 0,01% azida de sodio):**

- 500ml PBS
  - 5g BSA
  - 0,05g azida de sodio
- Almacenar hasta por 6 meses a 2-8°C.

#### **Diluyente de muestra y conjugado (PBS con 1% BSA y 0,1% Tween 20):**

- 500ml PBS
  - 5g BSA
  - 0,5ml Tween 20
  - 0,05gr azida de sodio
- Almacenar hasta por 6 meses a 2-8°C.

#### **Buffer de lavado (PBS con 0,1% Tween 20):**

- 1000ml PBS
  - 1ml Tween 20
- Almacenar hasta por 6 meses a 2-8°C. Descartar si se evidencia contaminación.

### **Control de calidad**

En cada placa se deben incluir un control positivo (suero que se sabe que es positivo) y un control negativo (suero que se sabe que es negativo). El uso de estos controles nos asegurará que el procesamiento de la placa fue adecuado, y nos facilitará la lectura.

## **Resultados e interpretación**

Las muestras se designarán como positivas o negativas mediante comparación con los controles positivos y negativos.

## **Informe de resultados**

Registre los resultados en un formato de lectura de placas.

## **Bibliografía**

1. Wikipedia contributors. Immunofluorescence. Wikipedia, the free encyclopedia . 18-7-2006. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Ref Type: Electronic Citation
2. Walker,D.H. Diagnosis of rickettsial diseases. Pathol. Annu. 23 Pt 2, 69-96 (1988).
3. Walker,D.H., Burday,M.S. & Folds,J.D. Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. South. Med. J. 73, 1443-6, 1449 (1980).

## Anexo 2.

### Protocolo extracción de DNA a partir de garrapatas

1. 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.
2. Retirar la cantidad de muestras seleccionada del congelador. Adicionar 400  $\mu$ L de DNAzol a cada muestra (previamente triturada y macerada).
3. Con una punta azul (1000  $\mu$ L) sellada, realizar un macerado corto y limpiar las paredes del tubo que contiene la muestra.
4. Sedimentar el homogenizado centrifugando la muestra a 10000 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL (no suministrado en el estuche).
6. Agregar a la muestra 200  $\mu$ L de etanol al 100%.
7. Mezclar la muestra por inversión y vórtex. Mantener las muestras a temperatura ambiente durante 3 minutos.
8. Transferir la mezcla a la columna ubicada en el tubo de 2 mL (suministrada en el estuche de Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit).
9. Centrifugar la muestra a 8000 rpm durante 1 minuto.
10. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2 mL (suministrado en el estuche) y descartar el tubo con el centrifugado.
11. Agregar 500  $\mu$ L de Buffer AW1 a cada columna.
12. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
13. Transferir la columna a un nuevo tubo de 2 mL (suministrado en el estuche) y descartar el tubo con el centrifugado.
14. Agregar 500  $\mu$ L de Buffer AW2 a cada columna.
15. Centrifugar a 14000 rpm durante 6 minutos para garantizar el secado total de la columna.
16. Retirar la columna suavemente evitando que tenga contacto con el centrifugado, y ubicarlas en un nuevo tubo eppendorf de 2 mL (no suministrado en el estuche). Descartar el tubo con el centrifugado.
17. Agregar 55  $\mu$ L de Buffer AE a cada columna.
18. Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
19. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
20. Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL (no suministrado en el estuche). NO DESCARTAR EL CENTRIFUGADO. ES DNA EXTRAIDO.
21. El centrifugado obtenido en la primera elución (paso 18) se debe agregar a la misma columna.
22. Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
23. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
24. El centrifugado obtenido es DNA extraído. Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores estudios.

### Anexo 3.

#### Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en equinos

#### TÍTULO MÁXIMO DE ANTICUERPOS IgG ANTI-*R. rickettsii* EN EQUINOS DE VILLETA, CUNDINAMARCA

Vereda	No. muestras positivas/No. evaluadas	Título máximo de IgG anti- <i>R. rickettsii</i>							
		1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
Chapaima	3/8	3							
La Bolsa	3/4	3							
Chorrillo	1/4	1							
Payande	2/2	2							
Mave	1/5	1							
Alto de Torres	0/3								
Salitre Blanco	0/3								
Naranjal	2/4		2						
Salitre Negro	2/7	1	1						
Alto de Paja	1/2	1							
Mani	1/1		1						
La Mazata	0/1								
Cune	0/5								
Balsal	1/3		1						
El Puente	1/4				1				
Bagazal	0/1								
San Isidro	1/4		1						
Ilo Grande	1/6	1							
Cabecera Municipal	5/7		2	1				1	1
<b>Total</b>	<b>25/74</b>	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>			<b>1</b>	<b>1</b>

#### Anexo 4.

### Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en caninos

#### TÍTULO MÁXIMO DE ANTICUERPOS IgG ANTI-*R. rickettsii* EN CANINOS DE VILLETA, CUNDINAMARCA

Vereda	No. muestras positivas/No. evaluadas	Título máximo de IgG anti- <i>R. rickettsii</i>							
		1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
Chapaima	4/5	3						1	
La Bolsa	0/2								
Chorrillo	1/8	1							
Payande	0/4								
Mave	3/8	3							
Alto de Torres	0/5								
Salitre Blanco	2/11	1							1
Naranjal	1/3				1				
Salitre Negro	0/1								
Alto de Paja	0/5								
Mani	0/3								
La Mazata	1/3	1							
Cune	1/5								1
Rio Dulce	1/3	1							
Balsal	0/2								
El Puente	0/6								
Bagazal	0/9								
La Esmeralda	0/5								
San Isidro	0/2								
Potrero Grande	1/4	1							
Quebrada Honda	0/4								
Ilo Grande	0/6								
Cabecera Municipal	2/14	2							
<b>Total</b>	<b>17/118</b>	<b>13</b>				<b>1</b>		<b>1</b>	<b>2</b>

## Anexo 5.

### Seroprevalencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en bovinos

#### TÍTULO MÁXIMO DE ANTICUERPOS IgG ANTI-*R. rickettsii* EN BOVINOS DE VILLETA, CUNDINAMARCA

Vereda	No. muestras positivas/No. evaluadas	Título máximo de IgG anti - <i>R. rickettsii</i>							
		1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
Chapaima	1/4	1							
La Bolsa	0/1								
Chorrillo	0/5								
Mave	0/1								
Salitre Blanco	2/9	2							
Naranjal	6/12	6							
Salitre Negro	0/2								
Mani	7/8	7							
Cune	3/4	3							
Rio Dulce	1/1	1							
Bagazal	2/3	2							
La Esmeralda	0/2								
San Isidro	7/8	5	2						
Potrero grande	2/2	2							
<b>Total</b>	<b>31/62</b>	<b>29</b>	<b>2</b>						

