

# Contribuciones a la epidemiología de la rickettsiosis por *Rickettsia parkeri* en el área endémica del Uruguay: análisis serológico de caninos domésticos.



**Tesis de Maestría**  
PEDECIBA Biología



**Paula Lado Henaise**  
2013



*Mientras los hombres sean libres para preguntar  
lo que deben; libres para decir lo que piensan;  
libres para pensar lo que quieran; la libertad  
nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá.  
Robert Oppenheimer (1904-1967).*

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la colaboración de distintas Instituciones y Organizaciones. Las mismas son las siguientes:

- **Facultad de Veterinaria-UdelaR.** Especialmente, el Departamento de Parasitología Veterinaria.
  
- **Facultad de Ciencias-UdelaR.** PEDECIBA Biología.
  
- **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, Brasil.** Muy especialmente O Laboratório de doenças parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.
  
- **CSIC,** Programa de Pasantías en el Exterior.
  
- **CIDEC,** Proyectos de Investigación 2012.



## ÍNDICE

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>9</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>13</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Justificación.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Revisión bibliográfica.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Rickettsias.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.1 Agentes etiológicos.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.2 Taxonomía.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.3 Patogénesis y patofisiología de las rickettsiosis.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.4 Determinantes de la virulencia de las rickettsiosis.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.5 Diagnóstico de las rickettsiosis.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.6 Las rickettsiosis en los últimos años y su asociación a enfermedades humanas en Latinoamérica y el Caribe.....</b>	<b>39</b>
- <i>R. rickettsii</i> .....	<b>41</b>
- <i>R. prowazekii</i> y <i>R. typhi</i> .....	<b>43</b>
- <i>R. parkeri</i> .....	<b>44</b>

- <i>R. felis</i> .....	45
<b>4.1.7 Epidemiología de los patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Garrapatas.....</b>	<b>50</b>
4.2.1 Generalidades y Taxonomía.....	50
4.2.2 Origen.....	52
4.2.3 Efectos sobre hospederos.....	53
4.2.4 Morfología general de los ixódidos.....	55
4.2.5 Ciclo de vida de los ixódidos.....	61
4.2.6 Patología y capacidad vectorial.....	64
4.2.7 Garrapatas presentes en Uruguay.....	66
4.2.8 Garrapatas de hallazgo accidental en Uruguay.....	67
4.2.9 Garrapatas cuya presencia debe ser confirmada .....	67
4.2.10 Género <i>Rhipicephalus</i> .....	68
4.2.11 Género <i>Amblyomma</i> .....	71
<b>4.3 Materiales y Métodos.....</b>	<b>78</b>
4.3.1 Área de trabajo.....	78
4.3.2 Colecta de muestras de sangre de caninos domésticos.....	79
4.3.3 Obtención y almacenamiento de suero.....	80

4.3.4 Colecta de garrapatas: sobre hospederos y del ambiente.....	81
4.3.5 Identificación de las garrapatas.....	84
4.3.6 Colecta de roedores.....	84
4.3.7 Análisis serológico. Inmunofluorescencia Indirecta.....	85
4.3.8 Extracción de ADN de garrapatas.....	86
4.3.9 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN extraído.....	86
4.3.10 Análisis molecular de garrapatas en busca de ADN de <i>Rickettsia</i> spp.....	87
4.3.11 Análisis molecular de garrapatas en busca de ADN de rickettsias pertenecientes al SFG.....	88
4.3.12 Electroforesis.....	88
4.3.13 Análisis estadístico de los datos.....	89
<b>4.4 Resultados.....</b>	<b>91</b>
4.4.1 Determinación la prevalencia de infección de <i>Rickettsia</i> spp. en caninos domésticos residentes en la zona endémica de rickettsiosis en Uruguay.....	92
4.4.2 Determinación de la/s especies del género <i>Rickettsia</i> responsables por la respuesta inmune en esos hospederos, y determinar la prevalencia de la/s misma/s.....	93

<b>4.4.3 Determinación de si existe una relación entre la edad de los caninos y la presencia de anticuerpos anti-<i>Rickettsia</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>4.4.4 Determinación de si existe una relación entre la región donde viven los caninos y la presencia de anticuerpos anti-<i>Rickettsia</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>4.4.5 Determinación de si existe una relación entre la estación del año y la presencia de anticuerpos anti-<i>Rickettsia</i>.....</b>	<b>96</b>
<b>4.4.6 Correlación de la dinámica de infección canina a lo largo de un año con respecto a la dinámica estacional de <i>Amblyomma triste</i>.....</b>	<b>97</b>
<b>4.4.7 Análisis de la presencia de anticuerpos anti-<i>Rickettsia</i> spp. en roedores de la zona endémica de rickettsiosis en Uruguay; y sugerir la especie implicada en dicha respuesta.....</b>	<b>98</b>
<b>4.4.8 Determinación de la presencia de <i>Rickettsia</i> spp. del grupo de las fiebres manchadas en ejemplares de <i>A. triste</i> de ambiente y de hospedero colectados en el área endémica del Uruguay.....</b>	<b>99</b>
<b>4.5 Discusión.....</b>	<b>104</b>
<b>4.6 Perspectivas.....</b>	<b>118</b>
<b>4.7 Conclusiones.....</b>	<b>120</b>
<b>4.8 Referencias bibliográficas.....</b>	<b>122</b>

---

*Dedico este trabajo a  
todas aquellas personas  
que están dispuestas a  
equivocarse, que  
aprenden de sus errores,  
que enfrentan las  
adversidades con  
actitud y entienden que  
los desafíos son  
necesarios para crecer...*

---



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, sigue la regla de la inmensa mayoría de las investigaciones, donde el individualismo, si bien es importante, es solamente una parte, y donde la realidad es que el trabajo fue posible debido a varias personas, quienes aportaron desde diferentes puntos y con diferentes acciones, todas críticas y necesarias para lograr los objetivos. Es por esto que quisiera realizar algunos agradecimientos particulares.

Por suerte tengo varios agradecimientos que realizar, lo que demuestra que muchas personas han estado dispuestas a ayudar y aportar, lo cual me hace feliz.

En primer lugar a mi familia, muy especialmente a mis padres, Juan y Laura y a mi hermano, Gastón, quienes siempre me han apoyado e impulsado y confían en mi trabajo.

A mis amigos, esos pocos que hacen más que miles y que alimentan el alma con acciones simples, y palabras sinceras; cuyo apoyo fue particularmente importante durante este trabajo.

A José Manuel Venzal, Orientador de la Tesis, primeramente por haberme aceptado como estudiante y haberme dado la posibilidad de trabajar en un tema que me encanta. No puedo dejar de agradecerle su permanente ayuda y disposición, así como la compañía en las salidas de campo, y su amistad y confianza. Agradezco el apoyo en todos los aspectos, personal y profesional, en todo momento. Siento un gran cariño y admiración.

A Marcelo Labruna, co-orientador de esta Tesis. Agradezco el permitirme trabajar en el Laboratorio, confiar en mi trabajo, estar permanentemente a disposición para cualquier cosa, y siempre atento durante mis estancias en San Pablo. Más allá de lo académico, agradezco a Marcelo por las charlas y consejos personales, es una persona por la que tengo un profundo aprecio, y admiración.

A José Manuel Verdes, quien ha estado presente desde un comienzo y quien ha colaborado sustancialmente para que este trabajo sea posible. Agradezco su apoyo en diversos momentos en los que se presentaron dificultades.

Un especial agradecimiento a Mario Quintero, sin quien esta investigación hubiese sido muy difícil. Mario ha sido, no solo un gran colaborador del trabajo, sino un gran amigo y una hermosa compañía en las colectas; hemos viajado, reído y trabajado en conjunto de una forma muy disfrutable. De la misma forma, quiero agradecer a todo el equipo de Mario, a todo, muy especialmente a Diana, Federico y Daniela, quienes también han sido una gran ayuda, increíble compañía y muy buenos amigos. Gracias a ellos, las largas y agotadoras jornadas fueron un placer.

A todos mis compañeros del laboratorio de Parasitología Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria, particularmente a Darío, “Los Óscares”, Laura y María, quienes han sido un gran apoyo. A Oscar Castro le agradezco de corazón su presencia en todo momento, sus consejos, charlas, y la lectura crítica de este trabajo. Sus sugerencias son siempre nuevos pensamientos y aportan ideas y aspectos originales.

A de Souza y a Juan Martín Eguren, por su ayuda y compañía en las salidas de campo.

A todo el equipo de laboratorio de Marcelo Labruna, quienes no solo me enseñaron trabajo de laboratorio sino que me apoyaron en distintos momentos tormentosos y con quienes compartí hermosos momentos. Volví de San Pablo no solo con nuevo conocimiento académico, sino con grandes amigos.

No puedo dejar de individualizar a Francisco Borges Costa “Chico mentirinha”, quien de una forma única, me enseñó la técnica de IFI, entre inglés, español y portugués, reimos y nos entendimos.

De la misma forma, agradezco a Thiago Fernandes Martins, por la identificación de las ninfas analizadas en el presente estudio.

A José Piaggio y Ricardo Dias, por los análisis estadísticos de los datos, quienes han tenido paciencia y dedicación.

Por último, quiero agradecer a una persona muy especial, de la que aprendí, con quien viví momentos de los que son escasos y únicos, compartí interesantes conversaciones y quien sin percatarse me ha ayudado y apoyado de una forma sustancial y poco convencional. Una persona cuyo valor personal es increíble, persona de las que uno desea que haya más. Gracias, por todo.

Agradezco a todos por hacer posible la realización de este trabajo de la mejor manera posible, y permitir así, que cumpla uno de los objetivos de mi vida.....de corazón.....muchas gracias a todos!!!!



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µm</b>	micras
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>BG</b>	<i>Belli</i> group
<b>BSF</b>	Brazilian spotted fever
<b>CG</b>	<i>Canadiensis</i> group
<b>dNTP</b>	deoxynucleotide triphosphates
<b>DPVURU</b>	Departamento de Parasitología Veterinaria, Uruguay
<b>EE. UU.</b>	Estados Unidos
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunoabsorbent assay
<b>gltA</b>	citrate synthase gene
<b>H</b>	hembra
<b>HEL</b>	human embryonic lung
<b>IFI</b>	inmunofluorescencia indirecta
<b>IgG</b>	inmunoglobulina G
<b>L</b>	larva
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>M</b>	macho
<b>Mb</b>	mega bases
<b>MSF</b>	Mediterranean spotted fever
<b>MLST</b>	Multi locus sequence typing
<b>N</b>	ninfa
<b>A</b>	adulto

<b>ml</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetros
<b>nm</b>	longitud de onda
<b>O</b>	Oeste
<b>°C</b>	grados Celsius
<b>ompA</b>	outer membrane protein A
<b>ompB</b>	outer membrane protein B
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RFLP</b>	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>RMSF</b>	Rocky Mountain Spotted Fever
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>S</b>	Sur
<b>Sca1</b>	surface cell antigen protein 1
<b>Sca2</b>	surface cell antigen protein 2
<b>SFG</b>	spotted fever group
<b>spp.</b>	Especies
<b>TG</b>	Typhus group
<b>TRG</b>	Transitional group





## RESUMEN

La rickettsiosis por *Rickettsia parkeri* constituye una zoonosis emergente en el Uruguay, considerándose los Departamentos del Sur del país el área endémica de esta enfermedad. Es una enfermedad infecciosa transmitida en el territorio uruguayo por la especie de garrapata más agresiva y que más frecuentemente parasita al ser humano, *Amblyomma triste*. Este vector parasita en sus estadios de larva y ninfa a micromamíferos y en su estado adulto principalmente a caninos domésticos.

El objetivo general del presente trabajo fue aportar información a la epidemiología de esta rickettsiosis a través de un relevamiento serológico de caninos domésticos. Para ello, se trabajó con una población de 1000 caninos residentes en 4 Departamentos del área endémica, a los que se les realizó el diagnóstico serológico mediante la técnica de elección, la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, utilizándose antígenos pertenecientes a 3 especies del género *Rickettsia*: *R. rhipicephali*, *R. felis* y *R. parkeri*. Paralelamente se colectaron garrapatas tanto de ambiente como de hospederos (caninos y roedores), y las mismas fueron analizadas mediante PCR convencional en busca de ADN rickettsial. Asimismo, se realizó análisis serológico de los roedores muestreados.

De las muestras de suero correspondientes a la población canina de estudio, 203 fueron seroreactivas para al menos una de las especies de *Rickettsia* empleadas en la técnica serológica, por lo que la prevalencia de *Rickettsia* spp. fue de 20.3%. A través de las titulaciones de los sueros, se determinó una prevalencia de *R. parkeri* de 14%, única especie de

patógeno determinada infectando a los ejemplares de ixódidos colectados.

Se colectaron y muestrearon 8 roedores, cuyos análisis serológicos evidenciaron un contacto previo con *R. parkeri* en dos de ellos, identificados como *Scapteromys tumidus*.

Se colectaron 166 garrapatas a lo largo del trabajo, las que se identificaron como pertenecientes a 4 especies: *A. triste*, *A. tigrinum*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes longiscutatum*. Mediante PCR se determinó la presencia de ADN rickettsial en 14 ejemplares correspondientes a *A. triste*, *A. tigrinum* e *I. longiscutatum*. Sólo fue posible el secuenciamiento del ADN obtenido a partir de dos ixódidos, siendo uno de ellos *A. triste* (colectado de *S. tumidus*) y el otro *A. tigrinum* (colectado de un canino doméstico). Se determinó que las secuencias eran compatibles con *R. parkeri* en ambos, con un 99% de similitud con EF102238 y otras secuencias; y un 100 % de similitud con KC003476 y otras secuencias, respectivamente.

Análisis estadísticos permitieron evidenciar una mayor proporción de perros seropositivos en la parte de la población de más de un año de edad cuando comparada frente a la menor al año de edad; a su vez, se determinó un acúmulo de la proporción de seropositivos en primavera (32%) respecto a las demás estaciones (14.9%-16.6%).

En conclusión, se ha logrado determinar, por primera vez en nuestro país, un valor de seroprevalencia de *Rickettsia* spp., así como de *R. parkeri*, en perros residentes en el área endémica de rickettsiosis; y se logró aportar información al conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, tanto a través de la información antes mencionada como a través de la serología de roedores, estacionalidad de caninos seropositivos, acúmulo de sueros

caninos seroreactivos en los animales mayores a un año de edad, y el hallazgo por primera vez, de una diferente especie de garrapata (*A. tigrinum*) infectada por el patógeno circulante.



# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

En 1990, el grupo del Dr. Conti-Díaz reporta los primeros casos autóctonos de “rickettsiosis cutáneo ganglionar” transmitida por garrapatas en Uruguay. Hasta ese momento en las Américas, existía únicamente de forma autóctona la fiebre manchada de las montañas rocosas en EE.UU, el tifus de San Pablo y la fiebre Tobia de Colombia, todas provocadas por el mismo agente: *Rickettsia rickettsii*. Si bien en dicho trabajo los casos clínicos se asociaron a *Rickettsia conorii*, la información conceptual de dicho trabajo es de gran valor, sobre todo considerando la cronología (Conti-Díaz y col., 1990).

Algo más de 10 años después, ya se asocia a la enfermedad en nuestro país con *Amblyomma triste* (confundida comúnmente con *Amblyomma maculatum*, especie que no se halla presente en Uruguay) (Martins y col., 2014). A su vez, el vínculo patógeno/*A. triste* implica una asociación con el ser humano, dada la destacada antropofilia de ese ixódido. No solo se la asoció a ambientes vinculados con el hombre, sino a áreas principalmente suburbanas y rurales, las que eran preferidas por esa misma especie de garrapata (Conti-Díaz, 2001). Paralelamente, se considera al sur del país como área endémica, más precisamente a los Departamentos costeros al Río de la Plata y Océano Atlántico (Conti-Díaz, 2001). Recordando que

hasta este momento se consideraba que el patógeno involucrado era *R. conorii*, a consecuencia de los tests diagnósticos disponibles en el momento que empleaban antígenos de dicha especie, ya para el año 2003 se expresa la posibilidad de que los casos clínicos humanos observados sean provocados por una nueva especie de *Rickettsia* (Conti-Díaz, 2003).

Poco después, Venzal y col., (2004) logran mediante el uso de técnicas moleculares el diagnóstico de *Rickettsia parkeri* en *A. triste* de Uruguay, determinando la infección de las garrapatas colectadas en el área considerada endémica, por PCR, con el agente rickettsial *R. parkeri*, paso muy significativo en el conocimiento de la enfermedad, por la determinación de la especie de patógeno implicada. A continuación se logró el aislamiento del patógeno a partir de ejemplares de *A. triste* infectados de Uruguay (Pacheco y col., 2006).

A partir de estos trabajos, se realizaron estudios epidemiológicos dirigidos hacia el vector y sus hospederos. Así, se determinó que en Uruguay esta especie de ixódido presenta una estacionalidad marcada, observándose los adultos entre los meses de Agosto y Febrero, con un importante pico desde finales de la primavera hasta el comienzo del verano. Por otra parte, los estadios inmaduros se presentan en el período comprendido

entre Noviembre y Mayo, con un pico en verano, desde Enero hasta Marzo. Tanto los adultos como las larvas y ninfas disminuyen su actividad de forma notoria en los meses de menor temperatura, es decir, desde Mayo hasta Julio (Venzal y col., 2008a). Esta información junto con las observadas para el Delta del Paraná en Argentina indican la existencia de una generación completa al año (Nava y col., 2008a). Mientras que los adultos muestran en Uruguay una predilección por los caninos y secundariamente parasitan al hombre, las larvas y ninfas se hallan frecuentemente en mamíferos de pequeño porte (Venzal y col., 2008a).

Se ha reportado que la actividad estacional de los adultos coincide con el aumento de los casos de rickettsiosis humana por *R. parkeri* (Conti-Díaz y col., 2009; Venzal, 2013). Actualmente solo existen casos humanos de *R. parkeri* en USA y Argentina (Paddock y col., 2004; Romer y col., 2011) además de Uruguay (Conti-Díaz y col., 2009; Portillo y col., en prensa).

De esta forma, a través de la historia de la rickettsiosis en nuestro país, se tiene un consistente conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad zoonótica, que implica información acerca de la presentación clínica, el patógeno responsable, el vector, así como su estacionalidad y hospederos.

Dado que los adultos de *A. triste* parasitan principalmente a caninos domésticos, y constituyen además la especie de garrapata que más frecuentemente parasita al ser humano en el territorio uruguayo (Venzal y col., 2003d; 2004), junto con el estrecho relacionamiento mascota/hombre, el propósito de este trabajo es determinar el posible rol del canino en la epidemiología de esta enfermedad rickettsial en la naturaleza.

## **JUSTIFICACIÓN**

Tal como se mencionó en la sección anterior, Uruguay es uno de los pocos países donde se han confirmado casos de rickettsiosis humana causados por *R. parkeri*. Si bien está determinado el vector involucrado en la transmisión al ser humano en nuestro país, siendo éste *A. triste*, y teniendo en cuenta que se conoce la dinámica estacional del mismo, aún hay vacíos en la literatura respecto a la epidemiología de la enfermedad en el área endémica. Es necesario conocer la situación de los principales hospedadores primarios de dicha especie de garrapata, que son los caninos domésticos, para poder luego dilucidar la dinámica de la enfermedad en el área endémica, así como realizar un adecuado diagnóstico, y desarrollar estrategias de prevención y control.

También debe considerarse, que al tratarse de una zoonosis, implica la participación directa tanto de Médicos como de Veterinarios, y estos últimos usualmente son la primera línea de prevención en estas enfermedades, por lo que determinar la situación de los animales con respecto a esta enfermedad es crucial para los pasos siguientes.

## **Hipótesis**

Los caninos domésticos residentes en el área endémica de rickettsiosis estarían infectados por *R. parkeri* y tendrían un rol en la epidemiología de la enfermedad. Podrían estar actuando como hospederos vertebrados amplificadores del patógeno, favoreciendo así el mantenimiento del patógeno en la naturaleza a largo plazo.

## **OBJETIVOS**

**General:** Contribuir al conocimiento de la epidemiología de la rickettsiosis por *Rickettsia parkeri* en el área endémica del Uruguay a través de un análisis serológico de caninos domésticos, principal hospedero del estadio adulto de *Amblyomma triste*, vector de la enfermedad.

### **Específicos:**

- Determinar la prevalencia de infección de *Rickettsia* spp. en caninos domésticos residentes en la zona endémica de rickettsiosis en Uruguay.
- Determinar la/s especies del género *Rickettsia* responsables por la respuesta inmune en esos hospederos, y determinar la prevalencia de la/s misma/s.
- Determinar si existe una relación entre la edad de los caninos y la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia*.
- Determinar si existe una relación entre la localidad de los caninos y la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia*.
- Determinar si existe una relación entre la estación del año y la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia*.



- Correlacionar la dinámica de infección canina a lo largo de un año con respecto a la dinámica estacional de *Amblyomma triste*.
- Analizar la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia* spp en roedores de la zona endémica de rickettsiosis en Uruguay; y sugerir la especie implicada en dicha respuesta.
- Determinar la presencia de *Rickettsia* spp. del grupo de las fiebres manchadas en garrapatas colectadas en el ambiente y hospederos en el área endémica a lo largo de este trabajo. Identificar la especie de patógeno involucrada.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **RICKETTSIAS**

#### **Agentes etiológicos**

Las rickettsias son pequeños (0.3-0.5 x 0.8-1.0  $\mu\text{m}$ ) cocobacilos pleomórficos gram-negativos intracelulares parásitos obligados de células eucariotas (Woese, 1987), capaces de reproducirse tanto en el núcleo como en el citosol de las células invadidas. Estas bacterias tienen una estructura de Gram negativas trilaminar que consiste en: membrana interna formada por dos capas, peptidoglicano, y membrana externa formada también por dos capas. El genoma es pequeño, teniendo entre 1 y 1.6 Mb; consistiendo en un único cromosoma circular simple (Raoult y Roux, 1997).

El género *Rickettsia* es un excelente paradigma para entender el proceso de evolución reductiva. Se especula que la diversificación del genoma es resultado de la pérdida de genes (Blanc y col., 2007). La reducción del genoma se ha reconocido en varias bacterias intracelulares, que tienen una tendencia a la alta dependencia y obligatoriedad de permanecer parasitando a células eucariotas, tal como es el caso de las rickettsias y las

clamidias (Zientz y col., 2001). Estas bacterias que viven intracelularmente se adaptan a ese nicho y pueden terminar perdiendo algunos de sus genes funcionales requeridos para la vida libre. Muchos de estos patógenos de genoma pequeño exhiben una reducción en el número de genes correspondientes a más de una categoría funcional, como ser procesos celulares básicos y biosíntesis de intermediarios metabólicos (Moran y Mira, 2001).

### **Taxonomía**

Pertenecen al orden rickettsiales subdivisión alfa de las Proteobacterias, familia Rickettsiaceae (Pacheco y col., 2007; Raoult y Roux, 1997).

Clásicamente las enfermedades causadas por rickettsias patógenas fueron clasificadas en dos grupos: el tifus (TG) compuesta por *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*, y el grupo de las fiebres manchadas (SFG), compuesto por más de 20 especies con garrapatas como vector principal (Raoult y Roux, 1997). Esta división era debida principalmente a la presencia de diferentes antígenos lipopolisacáridicos (LPS) (Yu y Walker, 2010). Otras rickettsias han mostrado particularidades antigénicas y genéticas que impiden su inclusión en el TG o en el SFG, tales como

*Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*, reportadas en garrapatas del continente americano (McKiel y col., 1967; Labruna y col., 2007a, 2007b). Con el descubrimiento de una variedad de nuevas rickettsias en diferentes órdenes de artrópodos terrestres, la mayoría viviendo de forma libre y también con los análisis genéticos de plásmidos como el de *Rickettsia felis*, el género ha sido reclasificado en diferentes grupos: TG, SFG, grupo transicional (TRG), grupo *bellii* (BG), grupo *canadensis* (CG) y otros grupos básicos (Gillespie y col., 2007; Weinert y col., 2009).

### **Patogénesis y patofisiología de las rickettsiosis:**

Existen dos proteínas importantes de membrana externa en los integrantes del género *Rickettsia*: OmpA y OmpB. Esta última está en todas las especies de *Rickettsia*, mientras que OmpA está presente solo en las rickettsias del SFG (Yu y Walker, 2010).

Experimentos *in vitro* mostraron que las *Rickettsias* se adhieren a la célula huésped a través de sus proteínas de superficie, OmpA, OmpB, Sca1 y Sca2, así como a receptores celulares (Martínez y col., 2005). Luego de la adhesión, las rickettsias inducen a la “integración” por parte de las células endoteliales no fagocíticas. En cuanto entra a la célula blanco, lisa la

membrana del fagosoma, escapando al citoplasma. La *Rickettsia* se multiplica por fisión binaria con un tiempo de duplicación de 8 horas. Ambos grupos de rickettsias (TG y SFG) se reproducen en el citoplasma, pero las rickettsias del SFG también pueden invadir y multiplicarse en el núcleo (Yu y Walker, 2010).

La célula diana *in vivo* es el endotelio vascular. El efecto patofisiológico crucial de la infección del endotelio es el aumento de la permeabilidad, lo que conduce a una erupción, hipovolemia, hipotensión, edemas cerebral y pulmonar, así como falla orgánica. Los mecanismos patogénicos de la lesión endotelial incluyen la formación de especies tóxicas reactivas del oxígeno por parte de las células endoteliales, daño en la membrana celular luego de que la rickettsia sale de la célula, y apoptosis inducida de las células endoteliales infectadas por parte de los linfocitos T citotóxicos (Yu y Walker, 2010).

### **Determinantes de la virulencia de las rickettsias:**

Las rickettsias carecen de exotoxinas y los LPS no son tóxicos, y aparentemente no tienen que ver con la patogénesis en las infecciones. Al ser bacterias intracelulares obligadas, dependen para sobrevivir de



enzimas para la modificación de proteínas y ADN. Muchas de las proteínas están relacionadas tanto a la entrada como a la salida de la célula huésped, como por ejemplo las adhesinas y las enzimas membranolíticas, que se desarrollan brevemente a continuación.

Adhesinas: Importantes en el primer contacto e imprescindibles para realizar la invasión del endotelio vascular. Tres proteínas de membrana de las rickettsias han sido identificadas como adhesinas: OmpA, OmpB y Sca2 (Li y Walker, 1998; Martínez y col., 2005; Cardwell y Martínez, 2009).

Enzimas membranolíticas: el mecanismo de lisis de la membrana fagocítica y de la membrana de la célula huésped ha sido hipotetizado como mediado por una fosfolipasa (Radulovic y col., 1999; Renesto y col., 2003). Análisis genómico ha mostrado 4 proteínas con posible potencial membranolítico: patatina B, Hemolisina A, Hemolisina C, y fosfolipasa D (Andersson y col., 1998; Ogata y col., 2001; McLeod y col., 2004).

A pesar de la información disponible hasta ahora y de los avances tecnológicos, aún no hay vacunas disponibles para ninguna de las enfermedades rickettsiales que se conocen.

## Diagnóstico de las rickettsiosis

Con el objetivo de realizar el diagnóstico de una rickettsiosis en su fase aguda, las técnicas deben permitir hacer dicho diagnóstico en un tiempo relativamente corto para manejar adecuadamente la evolución del paciente, antes de comenzar el tratamiento.

A partir de biopsias de zonas lesionadas, el diagnóstico inmunohistoquímico y el ensayo de Shell-vial ofrecen ventajas. Ambos son sensibles y específicos siempre que se comiencen previo al tratamiento del paciente. Por otro lado, son tests que llevan mucho tiempo y requieren de personal entrenado, por lo que son difíciles de instaurar en diagnósticos de rutina.

### Diagnóstico serológico

Históricamente, el diagnóstico de las enfermedades rickettsiales se realizaba empleando el test de Weil-Félix, el que se basa en la reactividad cruzada entre antígenos de rickettsias y de las bacterias del género *Proteus* (OX-2 y OX-19) (Parola y col., 2005). A continuación de este test, y en los recientes años se han utilizado algunos como ser Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Haemaglutinación Indirecta, Fijación del complemento y test de aglutinación en látex (Kaplan y col., 1986; Walker 1995).

De entre los tests serológicos más usados, la IFI representa al más sensible (94%), mientras que el de Weil-Félix es el menos sensible (47%) (Kaplan y col., 1986).

Desde hace años y hasta la fecha el diagnóstico serológico de elección y de referencia es la IFI, tanto para animales como para humanos (La Scola y Raoult, 1997; Yu y Walker, 2003); desarrollado originalmente con suero de ratón (Philip y col., 1978). Si bien la prueba es fiable en sus resultados, no permite diferenciar entre las distintas especies pertenecientes al SFG (Hechemy y col., 1986). Esto es debido a las reacciones cruzadas que existen entre las mismas.

Actualmente se considera que cuando se enfrenta un suero a antígenos provenientes de distintas especies, cuando aquel es reactivo frente a una especie con un título al menos 4 veces mayor que a la/s restante/s especies testadas; la respuesta inmune observada es consecuencia del contacto con la especie con títulos homólogos (La Scola y Raoult, 1997; Horta y col., 2004; Horta y col., 2007); siendo los títulos de anticuerpos homólogos mayores a los heterólogos.

De todas formas debe considerarse que cuando se toman dos muestras, separadas normalmente por 10-15 días, para evidenciar seroconversión, el

tratamiento temprano con antibióticos puede interferir con la producción de Inmunoglobulinas (Kaplan y col., 1986).

### Cultivos celulares

Varios métodos de aislamiento se han utilizado, incluyendo inoculación en cobayos (Pinter y Labruna, 2006), ratas, otros animales, así como cultivos en diferentes líneas celulares como células Vero (Eremeeva y col., 2001; Pinter y Labruna, 2006), HEL (La Scola y Raoult, 1996), etc.

Aunque este método es considerado el mejor desde el punto de vista de lograr un diagnóstico definitivo, ofrece algunos inconvenientes: una proporción considerable de los aislados rickettsiales se pierden durante los pasajes (Parola y col., 2005), y a su vez, cultivos de pacientes tratados pueden resultar negativos (Ngonyo Maina, 2012). Estos factores, sumados al tiempo que lleva esta técnica, hacen que no sea buena para realizar como rutina de diagnóstico en la clínica. En contraste, es un excelente método para fines científicos.

### Histoquímica e inmunohistoquímica

Muestras de tejido pueden teñirse tanto con Giemsa como con Giménez para visualizar las rickettsias (La Scola y Raoult, 1997).

La inmunohistoquímica en biopsias de lesiones o incluso éscaras, ya sea por reacción de fluorescencia o de peroxidasa son más asertivas que las antes mencionadas, y demuestran la presencia de los patógenos en el endotelio vascular. Si bien es relativamente específica no permite diferenciar entre las especies de las fiebres manchadas (Parola y col., 2005).

Estas técnicas son más rápidas que las que implican cultivos celulares y a su vez pueden realizarse a partir de muestras obtenidas post mortem ya fijadas en formalina (Rutherford y col., 2004) o inclusive parafinizadas (Paddock, 1999).

Tal vez una limitación no menor de estos métodos es que a pesar de ser sensibles (70-90%), su empleo se restringe a pacientes que desarrollan algún tipo de erupción o lesión cutánea (Thorner y col., 1998).

### Técnicas moleculares

Sin duda, la técnica más extendida y empleada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La misma consiste en la detección de ADN rickettsial a través de la amplificación de una secuencia específica de genes conservados. Varios genes se han usado con éxito, como ser: *gtIA* (Citrato sintasa), *ompA/ompB* (proteínas de membrana externa) (Parola y col., 2005), entre otros.

Según Walker (1995) esta PCR, que es de tipo convencional puede sufrir de baja sensibilidad, característica que se ha ido mejorando con el tiempo y la tecnología disponible.

Si bien se han desarrollado otros tipos de PCR, como ser Nested PCR, la que presenta mayor especificidad y sensibilidad (Raoult y col., 2000), y qPCR, que también es más sensible y rápida, además de permitir cuantificar la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra (Jiang y col., 2004), en la práctica diaria se continúa llevando a cabo la PCR convencional, y secundariamente los variantes mencionadas. Una de las grandes ventajas de la PCR es que puede emplearse a partir de una amplia variedad de muestras: ectoparásitos, sangre, tejidos, etc.

En el contexto del desarrollo de la biología molecular, se han diseñado otros métodos alternativos a la clásica PCR, por ejemplo: RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción); combina PCR con el uso de enzimas de restricción específicas seguido por electroforesis (Regnery y col., 1985; Roux y col., 1996); MLST (Multi-locus sequence typing) que combina una amplificación por PCR seguida por secuenciamiento. Este último método puede caracterizar aislados de especies de bacterias usando las secuencias de fragmentos internos de genes housekeeping (Fournier y Raoult, 2009). Mide directamente la

variación de las secuencias de ADN en un set de genes y así caracteriza cepas por su perfil alélico único (Vitorino y col., 2007; Fournier y Raoult, 2009).

### **Las rickettsias en los últimos años y su asociación a enfermedades humanas en Latinoamérica y el Caribe**

En las últimas décadas se han descubierto nuevas especies de *Rickettsia* de patogenicidad desconocida, muchas de ellas aisladas de garrapatas. Algunas de ellas previamente fueron consideradas no patógenas, pero recientemente demostraron ser patógenas para humanos, tal es el caso de los siguientes integrantes del SFG: *Rickettsia slovaca*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae* y *R. monacensis* en Europa (Parola y col., 2005; Jado y col., 2007). En el caso de *R. massiliae*, la bacteria fue aislada en Sicilia (Italia) en 1985, e identificada recién en 2005 (Vitale y col., 2006). Además, *R. parkeri*, un viejo miembro del SFG reportado por primera vez en 1939 (Parker y col., 1939), demostró 65 años más tarde ser patógena (Paddock y col., 2004). El primer reporte de infección por esta especie de *Rickettsia* fue en ejemplares de *Amblyomma maculatum*, en Texas (Silveira y col., 2007).

Ocho especies de *Rickettsia* han sido asociadas con enfermedad humana en Latinoamérica y el Caribe: *R. rickettsii*, agente de etiológico de la fiebre de las montañas rocosas en México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y Argentina; *R. prowazekii*, causante del tifus epidémico en Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Guatemala, México y Perú; *R. typhi*, agente del tifus murino en Brasil, Colombia, Guatemala, México, Panamá y Puerto Rico; *R. felis* causa la fiebre manchada de las pulgas en México y Brasil; *R. parkeri*, responsable de la fiebre manchada en Brasil, Uruguay y Argentina; *R. africae*, que produce la fiebre africana por garrapatas en las Antillas menores; *R. akari* es la causa de la viruela rickettsial en Costa Rica y México; y *R. massiliae*, agente de fiebre manchada en Argentina, la que fue reportada en un viajero español procedente de Argentina el cual se presume adquirió la infección en ese país suramericano. De acuerdo con los datos publicados hasta el momento, los siguientes países no presentan ningún tipo de registro de rickettsias en América Central y América del Sur: Belice, Venezuela, Guyana, Surinam y Paraguay (Labruna y col., 2011).

Recientemente, se han desarrollado una gran cantidad de investigaciones sobre *Rickettsia* en Latinoamérica y al menos 8 especies nuevas se han descubierto en los últimos 10 años, la mayoría asociadas con garrapatas: *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *R. akari*, *R.*



*monteiroi*, y Candidatus '*R. andeanae*' (Labruna, 2009; Zavala-Castro y col., 2009; Hun y col., 2011; Pacheco y col., 2011).

Se desarrollan a continuación algunas de las especies de mayor relevancia en América del Sur.

***Rickettsia rickettsii***: Es la especie de rickettsia más patógena a nivel mundial (Parola y col., 2005). Ha sido reportada en Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y Argentina (Dumler y Walker, 2005; Paddock y col., 2008). La enfermedad es llamada Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (RMSF), así como también Fiebre Manchada Brasileira (BSF). En Brasil, casos letales de BSF en humanos se han reportado en el estado de San Pablo por más de 70 años (Horta y col., 2004). *R. rickettsii* mostró en Latinoamérica un incremento en su distribución y expansión en las últimas décadas. De hecho, es actualmente considerada una enfermedad reemergente en México, Sur y Centro América (Zavala-Castro y col., 2006; Estripeaut y col., 2007; Hidalgo y col., 2008; Labruna, 2009).

Diferentes especies de garrapatas han sido implicadas como vectores de acuerdo a las distintas áreas geográficas. Mientras las especies *Dermacentor andersoni* y *D. variabilis* constituyen los principales vectores en Estados Unidos (Dumler y Walker, 2005), *Amblyomma cajennense* ha

sido implicado como vector principal en América del Sur. Sin embargo, *A. aureolatum* es un vector reconocido en el área metropolitana de San pablo (Pinter y Labruna, 2006), donde también se considera a *R. sanguineus* como vector sospechoso (Moraes-Filho y col., 2009; Szabó y col., 2013).

Estudios llevados a cabo en Brasil han demostrado que en contraste con *A. cajennense*, *A. aureolatum* parece ser un reservorio muy eficiente de *R. rickettsii*, dado que usualmente el 100% de las garrapatas se infectan luego de alimentarse en un hospedero amplificador competente, como los cobayos (Labruna, 2009). Adicionalmente, Pinter y Labruna (2006) reportaron un 100% de transmisión transtadial (larva-ninfa) de *R. rickettsii* en *A. aureolatum*. Sin embargo, la densidad poblacional de *A. aureolatum* es generalmente baja, y los humanos son raramente parasitados por esta garrapata (Labruna, 2009).

La enfermedad producida por *R. rickettsii* es muy severa, y potencialmente fatal, tanto para caninos como para humanos. Dentro de las enfermedades transmitidas por garrapatas en las Américas es la más severa. Las tasas de mortalidad han sido estimadas en 20% en humanos en ausencia del tratamiento antibiótico adecuado, y 5% en pacientes que reciben antibióticos (Chapman y col., 2006). En humanos, la enfermedad

se presenta inicialmente con fiebre, dolor de cabeza severo, y malestar generalizado, aunque generalmente los pacientes también desarrollan mialgia, náusea, vómitos y fotofobia. A las dos semanas de la infección aparece una tríada clásica en la mayoría de los pacientes: fiebre, dolor de cabeza y erupción maculo-papular generalizada (Nicholson y col., 2010). El período de incubación es de entre 2 y 14 días (Thorner y col., 1998).

Los pacientes caninos presentan fiebre, letargia, vómitos y anorexia. A medida que el cuadro evoluciona, se desarrollan signos adicionales, incluyendo lesiones oculares, desordenes sanguíneos, dolores articulares, y anormalidades neurológicas (Greene y Breitschwerdt, 2006). Las fatalidades ocurren tanto a nivel humano como animal, particularmente cuando se retrasa el tratamiento adecuado, o cuando este no se instaura (Dantas-Torres, 2008).

***Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*:** *R. prowazekii* es el agente etiológico del tifus epidémico, la segunda rickettsiosis más severa del mundo. El único vector en América del Sur es el piojo del cuerpo del hombre, *Pediculus humanus corporis*. Durante las últimas décadas, esta rickettsiosis solamente ha sido reportada en Perú (Anaya, 2004). A diferencia de lo que ocurre en otra rickettsiosis, los humanos que sobreviven a infecciones agudas de *R. prowazekii* usualmente desarrollan

una infección latente asintomática por varios años, posibilitando una reagudización que puede comenzar nuevas epidemias infectando nuevos piojos (Labruna, 2009). Estudios recientes han reportado el aislamiento de este agente patógeno de ejemplares de *Amblyomma* en México, sugiriendo una participación de garrapatas en la ecología del tifus epidémico (Medina-Sanchez y col., 2005).

La ocurrencia de *R. typhi* en América del Sur se remonta a las primeras décadas del siglo pasado (Travassos y col., 1949). Es clásicamente transmitido por la pulga *Xenopsylla cheopis*. Excepto por unos pocos estudios recientes reportando tifus endémico en Brasil y Colombia (Silva y Papaiordanou, 2004; Hidalgo y col., 2008), no hay estudios clínicos o ecológicos en América del Sur.

***Rickettsia parkeri***: en 1939, el entomólogo y rickettsiólogo R.R. Parker y colaboradores reportan el aislamiento de una bacteria recuperada de ejemplares de *A. maculatum*, colectadas en Texas (Parker y col., 1939). Cuando se inocularon cobayos con el denominado “agente maculatum”, los animales desarrollaron una enfermedad de fiebre moderada que recordaba a otras rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas, incluyendo la RMSF y la MSF (Parker y col., 1939; Parker, 1940). Más tarde, investigadores caracterizaron a esta bacteria como única dentro del

SFG, y la designaron como *Rickettsia parkeri* en honor al rickettsiólogo antes mencionado (Lackman y col., 1949; 1965). Desde el descubrimiento de esta especie de *Rickettsia*, ha habido varias especulaciones acerca de su patogenicidad para humanos, y en 2004, 65 años después de su aislamiento, se logró comprobar su poder patógeno en humanos (Paddock y col., 2004). Hasta entonces, probablemente muchos casos de rickettsiosis humana por *R. parkeri* fueron atribuidos a casos leves de rickettsiosis por *R. rickettsii* (Paddock, 2009).

Actualmente, *R. parkeri* es reconocida como patógena para humanos con casos confirmados en Estados Unidos, Argentina, Brasil y Uruguay (Paddock, 2005; Seijo y col., 2007; Whitman y col., 2007; Conti-Díaz y col., 2009; Romer y col., 2011; Silva y col., 2011; Portillo y col., en prensa).

***Rickettsia felis***: al igual que su principal hospedero (pulgas del género *Ctenocephalides*), *R. felis* parece ser cosmopolita. En América del Sur, *R. felis* ha sido reportada infectando *Ctenocephalides* spp. en Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay, pero la infección humana ha sido únicamente reportada hasta el momento en Brasil (Venzal y col., 2006; Labruna y col., 2007c; 2011; Nava y col., 2008b).

## **Epidemiología de los patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas**

Si bien los seres humanos son susceptibles a varios patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas, incluyendo *Anaplasma phagocytophilum*, que causa la anaplasmosis humana; *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, y *E. ewingii* que inducen diferentes formas de ehrlichiosis; *Rickettsia rickettsii*, agente de la Fiebre de las Montañas Rocosas; *R. conorii*, causante de la Fiebre Manchada del Mediterráneo; y otras rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (SFG) recientemente reconocidas, tal como es el caso de la rickettsiosis causada por *R. parkeri*, son en general calificados como hospedadores accidentales. Con excepción de *E. canis* y tal vez *E. ewingii*, los caninos domésticos no son considerados reservorios primarios para estos patógenos, sino que al igual que el hombre son considerados hospederos accidentales.

En algunas rickettsias del grupo de las fiebres manchadas ha sido comprobada la transmisión transovariana en las garrapatas vectores, por lo que la infección es transferida de una hembra adulta a sus huevos, ocurriendo así la infección subsecuente de las larvas. Dicha infección pasa a los restantes estadios a través de las mudas, lo que se denomina transmisión transtadial (Nicholson y col., 2010).

Si bien generalmente la transmisión del patógeno al humano ocurre a través de las garrapatas más que directamente a partir de perros infectados, se ha descrito que la remoción manual de garrapatas ingurgitadas constituye un factor de riesgo potencial para la infección humana (Goddard, 1997), y puede ocurrir mediante la inoculación del patógeno en las membranas mucosas por dedos contaminados, tal como ha sido descrito en el caso de *R. conorii* (Nicholson y col., 2010).

Los caninos domésticos están frecuentemente expuestos a garrapatas, y evidencias de infecciones presentes o pasadas en los mismos puede emplearse para determinar si existe un riesgo de infección por parte de patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas en determinada área geográfica (Hinrichsen y col., 2001; Paddock y col., 2002; Foley y col., 2007; Bowman y col., 2009).

La distribución global de los patógenos rickettsiales transmitidos por ixódidos varía de acuerdo a la densidad y distribución del ácaro vector, así como la densidad poblacional de los hospederos reservorios (Shaw y col., 2001; Greene y Breitschwerdt, 2006; Greig y Armstrong, 2006; Neer y Harrus, 2006; Beugnet y Marie, 2009). Así, las expansiones de las poblaciones de garrapatas pueden introducir agentes rickettsiales a áreas geográficas nuevas (Bowman y col., 2009; Paddock y Yabsley, 2007).

## El entorno cambiante

Nuestros conceptos de distribución e intensidad de los patógenos transmitidos por garrapatas están fuertemente influenciados por una gran cantidad de factores, incluyendo parámetros ambientales, modificaciones en el uso de la tierra, cambios en las actividades humanas y animales, esfuerzos de vigilancia y prácticas diagnósticas. La variación en la ecología puede resultar en la expansión del número de garrapatas o de sus hospederos biológicos, y consecuentemente, conllevar a una expansión de las áreas de riesgo para la salud humana y animal (Nicholson y col., 2010).

Recientemente, estudios preliminares han indicado que las picaduras a humanos por parte de *Rhipicephalus sanguineus* son más frecuentes a medida que aumenta la temperatura (Parola y col., 2008). También se ha demostrado que estas garrapatas pueden moverse desde un hospedero a otro durante la alimentación activa (Little y col., 2007), lo que aumentaría el contacto entre patógenos, humanos y caninos domésticos (Nicholson y col., 2010).

De la misma forma, la disminución de la densidad poblacional de un hospedador e inclusive la extinción de la especie en un área geográfica pueden llevar a cambios en la dinámica ecológica de un agente, al igual que la ocupación por parte del ser humano y sus mascotas de zonas en



que los vectores son abundantes. Esta situación ha sido reportada para nuestro país, donde la antropización en determinadas áreas junto a la disminución poblacional de hospederos ha alterado en alguna medida la epidemiología de la rickettsiosis (Venzal, 2013).

Varios aspectos que he tratado hasta el momento demuestran que con el pasar del tiempo, la generación constante de nueva información, así como diversos avances tecnológicos en técnicas de diagnóstico y aplicadas a la investigación permiten conocer nuevos patógenos, viejos patógenos que afectan/infectan hospedadores, nuevos vectores, etc. aumentando y actualizando el conocimiento de la tríada epidemiológica de la enfermedad.

Paralelamente, cambios en las condiciones climáticas, así como la actividad humana (antropización de áreas, costumbres, modas, etc.) causan modificaciones bioecológicas y ecosistémicas, a veces incluso muy drásticas, que resultan en nuevos desafíos para los parásitos, ya que deben adaptarse a las nuevas condiciones a las que son enfrentados; y para nosotros, los investigadores, que intentamos responder algunas de las preguntas que surgen del flujo ininterrumpido de información que se genera a diario, así de las propias observaciones.

## GARRAPATAS

### Generalidades y taxonomía

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados en todos sus estadios, altamente especializados, que parasitan vertebrados y tienen la capacidad de transmitir una diversidad de patógenos a los animales, incluido el hombre (Jongejan y Uilenberg, 2004). Son arácnidos que se incluyen en el orden Parasitiformes, dentro del que se encuentran junto a los Mesostigmata y los Holothyrida. Estos últimos son un grupo de ácaros que se alimentan de los fluidos corporales de otros artrópodos muertos, y parecen presentar un comportamiento semejante al de los ancestros de las garrapatas que, a partir de este comportamiento alimentario, se habrían adaptado a la hematofagia. Dentro de los Ixódidos se reconocen tres familias: Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas), y Nuttalliellidae. La última está representada por una única especie, *Nuttalliella namaqua*, cuya distribución está limitada a Sudáfrica. Las restantes dos familias tienen representantes en diversos países del mundo, incluyendo Uruguay (Márquez -Jiménez y col., 2005).

Las garrapatas son los vectores que transmiten la mayor diversidad de patógenos, y son solamente superados por los mosquitos en la

transmisión de enfermedades de importancia en salud humana y/o animal  
(Venzal, 2008).

### **Ubicación taxonómica**

Phylum: Arthropoda  
Subphylum: Chelycerata  
Clase: Arachnida  
Subclase: Acari  
Orden: Parasitiformes  
Suborden: Ixodida  
Superfamilia: Ixodoidea  
Familia: Argasidae  
    Ixodidae  
    Nuttalliellidae

La familia Argasidae está constituida por 5 géneros; *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros*, y *Otobius*, y 193 especies aproximadamente (Guglielmone y col., 2010). Por su parte, la familia Ixodidae cuenta con 14 géneros (dos de ellos fósiles); *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nossoma*, *Rhipicentor*, y *Rhipicephalus* (incluido el subgénero *Boophilus*), y 702 especies (Guglielmone y col., 2010).

## Origen

Se estima que la aparición de las garrapatas se produjo en el Cretácico, hace aproximadamente 120 millones de años. Los fósiles más antiguos corresponden a tres especies: *Compluriscutula vetulum* (Poinar y Buckley, 2008), *Cornupalpatum burmanicum* (Poinar y Brown, 2003) y *Carios jerseyi*, correspondiendo a una antigüedad estimada de 90-100 millones de años, lo que pondría de manifiesto una temprana diversificación del grupo en las familias que conocemos. El carácter monofilético de los Ixódida ha sido evidenciado en diversos análisis filogenéticos (Crampton y col., 1996; Black y col., 1997; Murrell y col., 2001).

El modo de vida dependiente de la hematofagia ha evolucionado independientemente al menos 6 veces desde el Jurásico-Cretácico, hace alrededor de 145 y 165 millones de años. Actualmente se conocen en torno a 15.000 especies de artrópodos hematófagos distribuidos en 400 géneros (Ribeiro, 1989). Por otra parte, la cascada de coagulación sanguínea de los vertebrados evolucionó hace unos 400 millones de años y adoptó su forma actual hace unos 200 millones de años (Doolittle y Feng, 1987). La adaptación de los artrópodos hematófagos a la alimentación sanguínea implica el enfrentamiento con un sistema hemostático muy eficiente. Cabe destacar que distintos grupos de

organismos hematófagos han desarrollado, a partir de un ancestro no hematófago, mecanismos semejantes de inhibición del sistema hemostático del hospedador (Law y col., 1992).

### **Efectos sobre el hospedero.**

La actividad de los artrópodos parásitos determina diversos efectos directos e indirectos sobre sus hospedadores. Entre los efectos directos cabe destacar:

1. La pérdida de sangre, que ocasiona debilitamiento o incluso anemia cuando un número elevado de ectoparásitos afectan a un hospedador.
2. Desarrollo de miasis.
3. Inflamación de la piel y prurito, frecuentemente acompañado por pérdida de pelo (alopecia) o engrosamiento de la piel (liquenificación).
4. Respuestas tóxica y alérgica provocadas por los antígenos y sustancias anticoagulantes presentes en la saliva de los artrópodos inoculada durante el proceso de alimentación (Márquez-Jiménez y col., 2005).

Además de dichos efectos directos, uno de los principales roles desarrollados por los ectoparásitos es su acción como vectores de agentes patógenos, siendo las garrapatas el grupo que transmite la mayor diversidad de agentes: virus, bacterias, protozoarios, y nematodos. Los virus y las bacterias se transmiten directamente al hospedador, de modo que los ectoparásitos actúan como vectores mecánicos. Sin embargo, los protozoarios y nematodos precisan desarrollarse en el vector; por lo que en estos casos el artrópodo actúa como un hospedador intermediario o definitivo dependiendo del tipo de reproducción que el agente realice en el mismo. Una vez que el agente patógeno se desarrolla en el vector adquiere capacidad infectiva, de forma que puede ser transmitido a un nuevo hospedador cuando el vector se alimenta sobre él. A diferencia de la transmisión mecánica, la transmisión biológica requiere el transcurso de un período de tiempo desde que se produce la adquisición del agente patógeno hasta que este madura y se transforma en infectante. El vector puede continuar infectando hospedadores durante el resto de su vida (Márquez-Jiménez 2005).

Algunas veces el agente patógeno puede residir en un gran número de hospedadores vertebrados alternativos que pueden ser inmunes o verse

ligeramente afectados por la acción patógena. Estos son los llamados reservorios de la enfermedad (Márquez-Jiménez 2005).

De aquí en más me referiré a los artrópodos de la familia Ixodidae, que es la más relevante desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades rickettsiales, tanto a los animales como al hombre.

### **Morfología general de los ixódidos.**

Las garrapatas son ácaros relativamente grandes, con una longitud entre 2 y 20 mm. Antes de alimentarse presentan un cuerpo comprimido dorsoventralmente, similar al de otros ácaros, que se encuentra dividido en dos porciones: capítulo (o gnatosoma) e idiosoma. El capítulo es la porción más anterior y contiene: una estructura impar, el hipostoma, y dos estructuras pares, los quelíceros (bisegmentados e incluidos en la vaina de los quelíceros), y los palpos (tetrasegmentados, dispuestos lateralmente y con capacidad sensorial). El cuarto artejo de los palpos se encuentra reducido, situándose en la porción ventral del tercer artejo, y aparece constituido por gran cantidad de setas sensoriales. El extremo de los quelíceros es plano, de forma triangular, presentando una serie de dientes orientados lateralmente que se encuentran extremadamente

esclerotizados. Los quelíceros se mueven hacia delante y hacia atrás dentro de la vaina que los protege, cortando la piel del hospedador durante la alimentación. Las coxas de los palpos se encuentran fusionadas dando origen a la base del capítulo, cuya forma es característica de los distintos géneros. La porción ventral anterior de la base del capítulo se extiende anteriormente con el hipostoma, estructura media impar formada por la fuerte unión de dos piezas y que presenta una densa denticulación en la porción que se encontrará en contacto con la piel del hospedador. Los dientes de las distintas filas del hipostoma se orientan hacia la porción posterior de la garrapata, sirviendo de estructura de sujeción. En la cara dorsal de la base del capítulo de las hembras se localizan las áreas porosas, en las que secretan gran número de glándulas secretoras de feromonas.

Las garrapatas duras se mantienen fijadas durante varios días a la piel del hospedador, período en el que se produce la alimentación. En aquellas especies en las que quelíceros e hipostoma son largos su acción es suficiente para mantenerlas fijadas; sin embargo, en las especies que presentan quelíceros e hipostoma cortos, al proceso de fijación contribuyen además las sustancias cementantes que son liberadas con la saliva del artrópodo. Una vez se ha completado la fijación al hospedador,



los palpos aparecen lateralmente extendidos. El proceso de alimentación implica la liberación de cierto volumen de saliva por parte de la garrapata, con propiedades farmacológicas, que se prolonga durante la mayor parte del proceso de alimentación. El tráfico de sangre desde el hospedador y la saliva que este recibe posibilita la transferencia de distintos agentes patógenos entre uno y otro. El proceso de alimentación se desarrolla durante varios días, prolongándose sucesivamente en larvas, ninfas y adultos hembra. Los machos de numerosas especies, a pesar de mantenerse fijados en la piel, no incrementan su volumen corporal, mientras que los otros estadios del ciclo vital, especialmente las hembras, pueden incrementar su masa corporal en aproximadamente 100 veces. Sin embargo, el volumen de sangre ingerida es muy superior a este incremento de peso o volumen, por cuanto, poco después de que la sangre sea ingerida, se inicia la digestión de la misma y la excreción del exceso de agua, sales minerales y parte de los desechos del metabolismo, fundamentalmente a través de la saliva.

Conforme la garrapata completa su alimentación, el ángulo que forma con respecto a la piel se va incrementando, de forma que los animales alimentados se encuentran orientados perpendicularmente con respecto a ésta. Las garrapatas inducen una respuesta inmunitaria tanto innata

como específica, lo que determina que en un hospedador resistente tanto la viabilidad de las garrapatas como su carga parasitaria se reduzcan, provocando en algunos casos la muerte de la garrapata. La actividad inmunomoduladora local de la saliva en el sitio de fijación de la garrapata favorece el proceso de alimentación de ésta, facilitando de forma indirecta la transmisión bidireccional exitosa de distintos patógenos (Ribeiro, 1989). En sentido contrario, la inmunización del hospedador frente a los antígenos presentes en la saliva de la garrapata provoca el desarrollo de la respuesta defensiva del hospedador, que puede extenderse a los organismos patógenos que son transmitidos (Wikel, 1996, 1999).

En la porción dorsal o dorsal anterior del idiosoma aparece una zona esclerotizada que recibe el nombre de escudo dorsal. En los machos esta estructura recubre toda la superficie del idiosoma, mientras que en las hembras y ninfas, el escudo es incompleto, recubriendo exclusivamente la porción anterior. En los géneros de garrapatas que presentan ojos, éstos se sitúan en los márgenes laterales del escudo dorsal. Algunos géneros presentan un escudo ornamentado en el que aparecen manchas o bandas. En la porción ventral del idiosoma se encuentran las patas. Mientras que los adultos y las ninfas presentan cuatro pares de patas, las larvas sólo

tienen tres pares. Cada pata se encuentra unida al cuerpo por la correspondiente coxa, que con frecuencia aparece con una o dos espinas, que pueden ser interna/s y/o externa/s (Márquez-Jiménez 2005). Cada pata presenta además: trocánter, fémur, rodilla o genu, tibia y tarso, el que termina en un par de uñas y una estructura intermedia a modo de lengüeta, el pulvillo o carúncula (Onofrio y col., 2006). En la parte media dorsal de los tarsos del primer par de patas aparece una estructura sensorial especial, el órgano de Haller, provisto de numerosas setas sensoriales que actúan como quimiorreceptores e intervienen en la detección del hospedador.

Las larvas de las garrapatas duras carecen de sistema respiratorio traqueal, que se encuentra, sin embargo, presente en las ninfas y los adultos. Dicho sistema consiste en tráqueas ramificadas, y se evidencia morfológicamente externamente por un par de espiráculos que se encuentran situados lateralmente en la región ventral, tras las coxas del cuarto par de patas, y constituyen la terminación de ese sistema traqueal de estos ácaros. El espiráculo se encuentra rodeado por una placa estigmática cuya forma tiene interés taxonómico, pudiendo ser circular, oval o en forma de coma.

Las larvas y las ninfas no presentan diferenciación sexual, por lo que únicamente en el caso de los adultos, que poseen sexo definido, se observa dimorfismo sexual.

Tanto machos como hembras presentan una abertura genital o gonoporo, situado ventralmente en el idiosoma entre las coxas del segundo par de patas. El ano también se sitúa ventromedialmente, en el extremo posterior del cuerpo, por detrás del cuarto par de patas, estando rodeado por el surco anal, cuya posición posee importancia taxonómica. Cuando dicho surco está hacia anterior, la garrapata será prostriata (género *Ixodes*), mientras que cuando está hacia posterior, la garrapata será metastriata (restantes géneros).

El encuentro de machos y hembras se suele producir en el hospedador, facilitado por la emisión por parte de las hembras de feromonas de agregación y de reconocimiento sexual. Puesto que los machos carecen de estructuras genitales externas, la transferencia de los espermatozoides se realiza a través de un espermatóforo de forma esférica que es manipulado por los quelíceros del macho e introducido en el gonoporo de la hembra (Márquez-Jiménez 2005).

## **Ciclo de vida de los Ixódidos**

El ciclo vital de los ixódidos presenta cuatro estadios, que son: huevo, larva, ninfa y adulto (Márquez-Jimenez 2005). A su vez, entre los distintos estadios sufren mudas, pasando por etapas de “meta”, los que se suceden generalmente en el ambiente e incluyen: metalarva y metaninfa. El paso de un estadio postembrionario al siguiente implica la ingesta de un gran volumen de sangre de un hospedador, la digestión de la misma, así como cambios morfo-anatómicos, los que concluyen con la muda del tegumento y un período considerable de vida libre a la búsqueda de un nuevo hospedador.

Se calcula que el tiempo que una garrapata dura pasa sobre el hospedador es de aproximadamente el 10% del tiempo total de su ciclo vital. Cada hembra produce un elevadísimo número de huevos, lo que permite mantener los niveles de las poblaciones de garrapatas en condiciones naturales.

La mayor parte de las garrapatas son relativamente inmóviles, por lo que permanecen en la vegetación o en los nidos y madrigueras a la espera de un hospedador. Habitualmente, las garrapatas se localizan en la vegetación a diferentes alturas en función del grupo de hospedadores que va a utilizar cada estadio (reptiles, aves o distintos mamíferos, dentro de

los que encontramos roedores, lagomorfos, rumiantes y carnívoros). Mediante distintos quimiorreceptores, particularmente los situados en el órgano de Haller, son capaces de detectar diferencias en las presiones parciales de anhídrido carbónico y olores característicos emitidos por el hospedador. Cuando perciben la presencia de un hospedador dirigen el primer par de patas en la dirección de la que procede el estímulo y se preparan para, una vez transferidos por contacto, aferrarse al cuerpo del potencial hospedador. Posteriormente, la garrapata se desplaza hasta alcanzar el lugar de fijación predilecto. Cada uno de los estadios de una especie suele seleccionar una zona de fijación característica (Márquez-Jiménez 2005).

La bioecología de las garrapatas es el resultado de un proceso de adaptación a las condiciones medioambientales y la disponibilidad de hospedadores adecuados para cada uno de los estadios que aparecen en su ciclo biológico. El desarrollo del ciclo vital de una garrapata se encuentra estrechamente relacionado con la presencia efectiva de hospedadores adecuados en su área biológica, así como con la existencia de un microhábitat en el que sucedan las condiciones microclimáticas favorables. El gran número de combinaciones posibles entre condiciones ambientales y disponibilidad de hospedadores determina la gran cantidad

de tipos evolutivos que aparecen en los ixódidos. Así, se distinguen ciclos en los que intervienen tres, dos y un único hospedador. En los ciclos trifásicos, sin duda los más frecuentes, larva, ninfa y adulto se alimentan sobre hospedadores distintos (de la misma o distinta especie), de modo que la búsqueda de un hospedador se produce tres veces, desprendiéndose la garrapata del hospedador correspondiente al final del proceso de alimentación. En los ciclos difásicos, los tres estadios evolucionan en dos hospedadores diferenciados individualmente, de la misma o distintas especies. Durante la primera fase parásita, la larva realiza la muda *in situ* en su lugar de emplazamiento sobre el hospedador, de modo que la ninfa emergente se fija a ese mismo hospedador. En este caso, la búsqueda de un hospedador se realiza dos veces a lo largo del ciclo vital de la garrapata.

En los ciclos monofásicos los tres estadios se alimentan sobre un único hospedador, de modo que desde el momento en que se fija la larva e inicia el proceso de alimentación la garrapata permanece asida hasta que se desprende como adulto macho o como hembra alimentada y fecundada. Este último tipo de ciclo es el menos frecuente, habiéndose descrito para distintas especies de *Rhipicephalus* del subgénero *Boophilus* (Murrell y col., 2000; Beati y Keirans, 2001).

## **Patología y capacidad vectorial**

Tal como fue mencionado anteriormente, como consecuencia de sus hábitos hematófagos, las garrapatas tienen un papel relevante en la transmisión de distintos organismos patógenos (virus, espiroquetas, agentes rickettsiales, protozoos y nematodos), muchos de los cuales constituyen los agentes etiológicos de distintas enfermedades zoonóticas que afectan al hombre y los animales domésticos y silvestres.

El potencial vectorial de las garrapatas se justifica en razón de:

1. Lo prolongado de su período de alimentación, que permite la transmisión bidireccional de los agentes patógenos.
2. Digestión intracelular de la sangre ingerida.
3. La transmisión transtadial (larva → ninfa → adulto) y transovárica (transmisión vertical, de la hembra a la siguiente generación a través del ovario) de distintos agentes (algunas especies del género *Rickettsia* por ejemplo).
4. La coincidencia durante la alimentación de distintos estadios de una misma especie, lo que favorece la transmisión horizontal de los agentes patógenos.



5. Su capacidad para alimentarse sobre distintos hospedadores, que permite la transmisión de los agentes patógenos de unos hospedadores a otros.
6. Su enorme potencial de dispersión firmemente aferradas a la piel de sus hospedadores.
7. El potencial reproductor de las hembras, capaces de depositar cientos o miles de huevos y que posibilita un crecimiento rápido de las poblaciones de estos parásitos.
8. Su capacidad para mantenerse vivas tras largos períodos de inanición.

## **Garrapatas presentes en el Uruguay**

Siguiendo la nomenclatura de Venzal (2008); para el estatus de las garrapatas en el país se emplean los siguientes términos: residentes (según si fueron hallados alguno o todos sus estadios, o si se ha vuelto a comprobar su presencia en el país), accidentales (especies que penetran accidentalmente con su hospedador pero que no se reproducen en el país), a confirmar (especies con registros muy antiguos o dudosos, de las que se necesita nueva evidencia para confirmar su presencia en el país).

### **Familia Ixodidae Murray, 1877**

#### **Garrapatas residentes:**

##### **Género *Amblyomma* Koch, 1844**

*Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772)

*Amblyomma auricularium* (Conil, 1878)

*Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899

*Amblyomma longirostre* (Koch, 1844)

*Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, 1908

*Amblyomma tigrinum* Koch, 1844

*Amblyomma triste* Koch, 1844

**Género *Haemaphysalis* Koch, 1844**

*Haemaphysalis juxtakochi* Cooley, 1946

**Género *Ixodes* Latreille, 1795**

*Ixodes auritulus* Neumann, 1904

*Ixodes longiscutatus* Boero, 1944

*Ixodes loricatus* Neumann, 1899

*Ixodes pararicinus* Keirans & Clifford, 1985

**Género *Rhipicephalus* Koch, 1844**

*Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)

**Garrapatas de hallazgo accidental en Uruguay**

*Amblyomma argentinae* Neumann, 1905

*Amblyomma latum* Koch, 1844

**Ixódidos cuya presencia debe ser confirmada en Uruguay**

*Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)

*Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902

*Amblyomma rotundatum* Koch, 1844

A continuación se detalla información respecto a las principales especies de ixódidos que parasitan a los caninos domésticos en el Uruguay; las que pertenecen a dos géneros: *Rhipicephalus* y *Amblyomma*.

Se provee información actualizada de la distribución geográfica, importancia sanitaria y hospedadores para cada una de ellas.

**Género: *Rhipicephalus***

**Especie: *R. sanguineus* (Latreille, 1806)**

La primera referencia de esta especie para Uruguay es de Calzada (1935), posteriormente es señalada para perros por Rodríguez González y Lujambio (1954). Venzal y col., (2001, 2003a) la mencionan para todo el país, parasitando principalmente perros de ciudad y, en algunos casos, en perros rurales de los cascos de las estancias. También en Uruguay se la detectó en bovinos y humanos (D.G.S.V/Sanidad Animal Proyecto BID, 1994; Venzal y col., 2003b).

En la colección del Departamento de Parasitología Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria, UdelaR (DPVURU) hay un lote que contiene un macho colectado sobre un gato en el departamento de Montevideo.

**Hospedadores:** humano (M-H); mamíferos domésticos: perro (M-H-N-L), gato (M), bovino.

**Distribución:** prácticamente todo el país. En DPVURU existen lotes procedentes de los departamentos de Artigas, Canelones, Colonia, Durazno, Florida, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, Paysandú, Salto, San José, Rocha y Tacuarembó.

**Estatus en Uruguay:** especie residente.

**Importancia sanitaria:** esta especie es un reconocido vector de enfermedades a los perros en todo el mundo. Entre las más importantes están las babesiosis caninas causadas por *Babesia canis*, *B. gibsoni* y *B. vogeli* y la ehrlichiosis canina por *Ehrlichia canis* (Walker y col., 2000; Shaw y col., 2001; Uilenberg, 2006). También transmite otros dos agentes de enfermedades consideradas de menor patogenicidad como *Haemobartonella canis* y *Hepatozoon canis*.

Además, está implicada en la transmisión de especies de *Rickettsia* que afectan al humano, siendo el vector primario de la fiebre botonosa del

mediterráneo o fiebre de Marsella por *Rickettsia conorii* (Walker y col., 2000).

En Uruguay se trata de una garrapata muy frecuente en perros, pero ha sido citada en pocas oportunidades en la literatura del país. Venzal y col., (2007) buscaron mediante PCR la presencia de bacterias de la familia Anaplasmataceae y en particular de *Anaplasma* o *Ehrlichia*, pero con resultados negativos. Utilizando la misma técnica, también se testaron las mismas garrapatas para la detección de rickettsias, obteniéndose el mismo resultado.

Actualmente existe un gran debate acerca de esta especie de ixódido, no solo respecto al complejo al que pertenece, sino incluso sobre la validez del nombre *R. sanguineus* sensu stricto. Esto último se debe a la escueta descripción original, al extravío del ejemplar tipo correspondiente, así como a las similitudes morfológicas entre las especies conocidas hasta hoy, y a la gran diversidad intraespecífica. Ya han sido demostradas grandes diferencias biológicas y filogenéticas dentro de los que hoy conocemos como *R. sanguineus* en el nuevo mundo (Szabó y col., 2005; Moraes-Filho y col., 2011)

En cuanto a la actividad estacional de *R. sanguineus*, la misma fue estudiada sobre perros en el Sur de Uruguay, observándose que la actividad parasitaria de los adultos se registra desde agosto hasta octubre, alcanzando el máximo poblacional en primavera. Los adultos están ausentes entre abril y julio. Los inmaduros tienen su máxima actividad en verano, luego del pico primaveral de los adultos (Venzal y col., 2007).

**Género: *Amblyomma***

La información que se detalla a continuación corresponde a una actualización realizada por Martins y col., (2014).

**Especie: *A. aureolatum* (Pallas, 1772)**

Distribución geográfica: reportada para los departamentos de Artigas, Colonia, Maldonado, Río Negro, Rocha, Salto y Tacuarembó (Venzal y col., 2003c; Martins y col., 2014).

Importancia médico-veterinaria: si bien en Uruguay aún no se ha determinado su importancia sanitaria, esta especie ha sido identificada como vector de *Rickettsia rickettsii* en Brasil (Pinter y Labruna, 2006); y también se la ha hallado infectada por *Rickettsia bellii* en ese mismo país (Pinter y Labruna, 2006; Horta y col., 2007). Ha sido señalada como

posible vector de la babesiosis canina (Aragão, 1936) y se considera como el posible vector natural de *Rangelia vitalii*, agente causante de la rangeliosis canina (Loretti y Barros, 2005; Soares y col., 2011). La rangeliosis canina en Uruguay ha sido reportada en el departamento de Artigas, diagnosticándose como agente a “*Babesia vitalii*” (Sarasúa y Donati, 1976).

Hospedadores: los adultos de esta garrapata se alimentan sobre una variedad de hospedadores medianos a grandes, incluyendo al perro (*Canis familiaris*), bovino (*Bos taurus*), zorro perro (*Cerdocyon thous*), y mano pelada (*Procyon cancrivorus*) (Venzal y col., 2003a). Con respecto a los estadios inmaduros, larvas han sido recuperadas de aves de dos especies diferentes; zorzal collar blanco (*Turdus albicollis*), y zorzal común (*T. rufiventris*) (Venzal y col., 2005). En la colección DPVURU también hay material de ninfas colectadas sobre guazubirá (*Mazama gouazoubira*) y un adulto sobre un puma (*Puma concolor*) mantenido en cautiverio.

**Especie: *A. tigrinum* Koch, 1844**

Distribución geográfica: es probable que su distribución abarque todo el territorio nacional, hasta el momento se poseen referencias y material depositado en colección de los departamentos de Artigas, Canelones,



Cerro Largo, Colonia, Durazno, Flores, Florida, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, Paysandú, Rocha, Salto, San José y Soriano (Kohls, 1956; Sampaio y Larrosa, 1992; Venzal y col., 2003a).

Importancia médico-veterinaria: Esta especie se encuentra reportada parasitando al humano en Uruguay (Venzal y col., 2003d). En Bolivia ha sido hallada infectada por *R. parkeri* (Tomassone y col., 2010b) y en Argentina por *R. bellii* (Tomassone y col., 2010a) y *Coxiella burnetii*, esta última es el agente de la fiebre Q (Pacheco y col., 2013). Si bien el parasitismo a humanos es poco frecuente en Uruguay y demás países de la región, es una especie a tener en cuenta ya que podría transmitir a *R. parkeri*, así como también podría participar del ciclo enzoótico de la fiebre Q. Es una especie hallada comúnmente parasitando perros, pero aún no se comprobado que les transmita ninguna enfermedad.

Hospedadores: Los adultos se alimentan sobre una amplia variedad de hospedadores mamíferos incluyendo al perro (*C. familiaris*), ovino (*Ovis aries*), bovino (*B. taurus*), equino (*Equus caballus*), jabalí (*Sus scrofa*), zorro perro (*C. thous*), y humano (Sampaio y Larrosa, 1992; Venzal y col., 2003a, 2003b), en la colección DPVURU se posee un registro sobre zorro gris (*Lycalopex gymnocercus*). Se han hallado larvas en las aves trepador

grande (*Drymornis bridgesii*) y sabiá común (*T. amaurochalinus*) (Venzal y col., 2003a).

**Especie: *A. triste* Koch, 1844**

Esta especie pertenece al “complejo *Amblyomma maculatum*”, el que también incluye a *A. maculatum* Koch 1844, y *A. tigrinum* Koch 1844 (Estrada-Peña y col., 2005).

Distribución geográfica: se ha reportado para los Departamentos costeros al Río de la Plata y Océano Atlántico: Canelones, Colonia, Maldonado, Montevideo, San José y Rocha (Venzal y col., 2003a, 2003c, 2004, 2008a; Guglielmone y col., 2006; Venzal, 2008).

Importancia medico-veterinaria: es la principal especie de garrapata que parasita al humano en Uruguay, siendo muy agresiva. En Argentina, Brasil y Uruguay, ha sido hallada infectada con *R. parkeri* (Nava y col., 2008a; Cicuttin y Nava, 2013; Silveira y col., 2007; Venzal y col., 2004; Pacheco y col., 2006; Venzal y col., 2012). Casos de fiebre manchada atribuidos a *R. parkeri* y cuyo probable vector fue *A. triste* fueron confirmados para Argentina y Uruguay (Seijo y col., 2007; Romer y col., 2011; Conti-Díaz y col., 2009; Portillo y col., en prensa). En Uruguay los casos de rickettsiosis humana han sido reportados en diferentes departamentos del sur del país (Conti-Díaz y col., 1990, 2009; Conti-Díaz, 2001; Portillo y col., en prensa).

En ejemplares de *A. triste* de Uruguay también se buscaron otros posibles patógenos, y si bien se obtuvieron resultados positivos, los mismos correspondieron a bacterias endosimbiontes de garrapatas. Una de ellas es una Alfa-Proteobacteria que pertenece al orden Rickettsiales y la otra una Gamma Proteobacteria relacionada con el género *Francisella* (Venzal, 2008; Venzal y col., 2008c).

Si bien los perros son frecuentemente parasitados por *A. triste*, no se ha comprobado la transmisión de enfermedades por parte de la misma, aunque, *R. parkeri* ha sido determinada mediante biología molecular en sangre de perros en Bolivia y Estados Unidos (Tomassone y col., 2010b; Grasperge y col., 2012).

Hospedadores: los adultos se alimentan de medianos y grandes mamíferos: perro (*C. familiaris*), cabra (*Capra hircus*), bovino (*B. taurus*), caballo (*E. caballus*), venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*), león (*P. leo*) (de semicautiverio), y humano (Venzal, 2008; Venzal y col., 2003a, 2004, 2008a; Guglielmone y col., 2006). Las ninfas han sido halladas principalmente en apereá (*Cavia aperea*), ratón oscuro (*Necromys obscurus*), ratón colilargo chico (*Oligoryzomys flavescens*), ratón hocicudo (*Oxymycterus nasutus*), rata de pajonal (*Scapteromys tumidus*), y comadreja colorada chica (*Monodelphis dimidiata*), y registros ocasionales

en perro (*C. familiaris*) y murciélago de vientre blanco (*Myotis albescens*) (Venzal, 2008; Venzal y col., 2003a, 2008a). Las larvas también han sido halladas en algunos de los hospedadores mencionados para el estadio ninfal: ratón colilargo chico (*O. flavescens*), ratón hocicudo (*O. nasutus*), rata de pajonal (*S. tumidus*), y comadreja colorada chica (*M. dimidiata*) (Venzal y col., 2003a, 2008a).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de trabajo**

La República Oriental del Uruguay se sitúa en la región templada del Sureste de América del Sur. Con respecto a las coordenadas se sitúa entre los paralelos 30 y 35 S y los meridianos 53 y 58 O. Los límites del país son al Norte y Este con la República Federativa del Brasil, al Oeste con la República Argentina, al Sur con el Río de la Plata y al Este con el Océano Atlántico.

Biogeográficamente se encuentra en el Distrito Uruguayense de la Provincia Pampeana, región Neotropical. Este distrito se extiende también por el estado brasileño de Rio Grande do Sul y parte de las Provincias Argentinas de Entre Ríos y Santa Fe (Chebataroff, 1951, 1955; Cabrera y Willink, 1973). El mismo se caracteriza por la dominancia de ambientes de praderas subtropicales y clima templado subtropical sub-húmedo, con una temperatura media anual de 17 a 18 °C y precipitaciones de entre 1000 y 1200 mm. anuales.

Este trabajo se realizó en 4 Departamentos del país, localizados todos ellos en el Sur, costeros al Río de la Plata o al océano Atlántico. Los Departamentos muestreados y estudiados fueron: Canelones, Maldonado,

Montevideo, y Rocha. Estos Departamentos están incluidos dentro del área que se considera endémica para la rickettsiosis por *R. parkeri* en el territorio uruguayo.

### **Colecta de muestras de sangre de caninos domésticos**

Tal como se mencionó en la sección anterior de este trabajo, el objetivo general implica un análisis serológico de caninos domésticos. Para conformar la seroteca correspondiente, en primer lugar se determinó el número de muestras que se iba a analizar, así como las condiciones de trabajo.

Para el número de sueros, se realizó el cálculo estadístico correspondiente al tamaño de muestra, tomando como infinito a la población de caninos domésticos en el área de trabajo, y se tomaron los datos de prevalencia de las referencias más cercanas (Saito y cols., 2008). Así, el tamaño de muestra requerido fue de 293 caninos.

El muestreo se realizó en el contexto de Jornadas de Castración, bajo el consentimiento tanto del Médico Veterinario a cargo de las mismas, como de los dueños de los animales. Así, se aprovechó la alta concentración animal, al igual que los procedimientos normales previos a la cirugía, es decir, la colocación de una vía en los mismos, de forma de evitar el manipular animales que no está previsto que lo sean. Todos los

procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Se obtuvieron aproximadamente 2-3 cc de sangre por animal, y se registraron datos de sexo, edad y zona donde reside y tiene acceso, además de la presencia de garrapatas, en la medida que fue posible y no interfería con la dinámica de trabajo. La sangre se colectó en el momento de colocación de la vía, antes del pasaje de la anestesia para el procedimiento quirúrgico. La misma se colocó en tubos de plástico con tapa, de 80 x 12 mm, y se trasladó al laboratorio, donde fue refrigerada hasta continuar el procedimiento.

Las colectas de suero se realizaron durante 15 meses, con el objetivo de obtener muestras de todas las estaciones del año y poder hacer posteriormente un estudio comparativo.

### **Obtención y almacenamiento del suero**

Una vez obtenida la sangre, se procedió a centrifugarla a 2500 rpm por 15 minutos, de modo de lograr una óptima separación entre el suero y los demás elementos constitutivos de la sangre. Si luego de dicho procedimiento, el suero aún poseía elementos celulares de la sangre, se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Una vez obtenido un suero lo más claro y transparente posible, se lo almacenó en tubos



eppendorfs de 1,5 ml de volumen debidamente rotulados, en freezer a -20°C, hasta su posterior análisis por IFI.

Se muestrearon un total de 1547 caninos domésticos a lo largo del muestreo, de los que se analizó por IFI un n de 1000; correspondiendo 289 a verano, 222 a otoño, 214 a invierno y 275 a primavera.

### **Colecta de garrapatas:**

- 1. Sobre hospederos.** Se colectaron ejemplares de garrapatas tanto de perros como de roedores. En el primer caso correspondió mayoritariamente a los mismos perros de los que se colectó sangre, y en menor medida a garrapatas donadas por profesionales de clínicas veterinarias.

Con respecto a los primeros, cada vez que fue posible en las Jornadas, además de obtener la muestra de sangre se realizó una inspección en busca de ixódidos, y cuando fue posible se registró y se guardaron ejemplares en alcohol 95%. Los caninos eran examinados una vez anestesiados para la cirugía, principalmente a nivel craneal e interdigital, así como también ventral, lugares de predilección para dichos ectoparásitos. También se registró cuando fue posible la edad de los perros, con la mayor exactitud posible.

En el caso de los roedores se realizaron 3 salidas de campo (ver más abajo). En cada captura, se identificó la especie de roedor, y además de obtener una muestra de sangre, se procedió a revisar a los roedores en busca de ectoparásitos. Todos los ixódidos colectados fueron conservados y fijados en alcohol 95% y almacenados en el laboratorio.

Luego, se procedió a la identificación morfológica de los mismos siguiendo a Martins y col. (2013) para los adultos y ninfas de *Amblyomma*, y a Guimarães y col. (2001); Onofrio y col. (2006) para el género *Rhipicephalus*. Por otro lado, para la identificación de las ninfas de *Ixodes* se utilizó Boero (1944; 1957) y Venzal y col. (2008b). Paralelamente a la identificación, se realizó el conteo, registro y almacenamiento, para el posterior análisis molecular.

Tanto en el caso de los caninos como de los roedores, las garrapatas eran colectadas de la misma forma, a saber: con una pinza con ranuras, de punta fina, se tomaba el ectoparásito, sin hacer demasiada presión. La sujeción se realizaba en la parte anterior, de la base del capítulo, y con

cuidado, se tiraba del ejemplar intentando no dejar el hipostoma implantado en la piel del hospedero. Idealmente la fuerza para desprender al ixódido se hace en unos 90° respecto a la superficie del animal. En el caso de los roedores, dado que son parasitados por los estadios de larva y ninfa, además de hacer una inspección visual y llevar adelante el procedimiento antes descrito, se empleó un peine fino para evitar que los ejemplares de menor tamaño fueran ignorados.

**2. Del ambiente.** La colecta de garrapatas del ambiente se realizó a través del uso de banderas por arrastre en la vegetación de las áreas de muestreo, como se ha empleado en varios trabajos (Nava y col., 2011; Venzal y col., 2008a). Las banderas fueron confeccionadas con paño de algodón, de aproximadamente 120 cm de largo y 80 cm de ancho, de color blanco, para facilitar la observación de los ácaros en las mismas. A su vez, en uno de los lados menores se les adicionó una vara, a modo de facilitar el arrastre por la vegetación de bajo porte. Los ixódidos colectados fueron guardados en alcohol 95%, y una vez en el laboratorio se procedió a la identificación, separación por especie, conteo y

almacenamiento. Todos se mantuvieron conservados en alcohol 95% hasta su posterior análisis.

### **Identificación de las garrapatas**

Las garrapatas colectadas se identificaron morfológicamente a nivel específico, tanto adultos como ninfas, mediante observación en lupa binocular, siguiendo las claves antes mencionadas.

### **Colecta de roedores**

Se realizaron 3 salidas de campo para colecta de pequeños roedores. Dos de dichas salidas fueron al Depto. de Maldonado, específicamente a la Barra del Arroyo Maldonado, donde anteriormente ya se habían realizado colectas de esos mamíferos por Venzal y col., (2008a). El otro muestreo se realizó en el Dpto. de Canelones, en una chacra de la localidad de Pando. En todos los casos se emplearon trampas tipo Shermann, ideales principalmente para ratones, ratas y apereás. El número de trampas y duración de cada colecta se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Detalles de las colectas de campo.

Loc. Colecta	Fecha	N° noches	N° trampas	N° roedores
Barra Maldonado	30-31/01/2012	1	117	3
Pando	16-17/02/2012	1	60	1
B. Maldonado	26-27/04/2012	1	72	5

### **Análisis serológico. Inmunofluorescencia Indirecta**

Los sueros caninos, así como los de roedores se enfrentaron a antígenos de tres especies de rickettsias: *R. rhipicephali*, *R. felis* y *R. parkeri*, correspondiendo a las siguientes cepas: HJ5, Pedreira y At 24 (Silveira y col., 2007) respectivamente, conforme técnica previamente descrita (Horta y col., 2004; Zavala-Velázquez y col., 1996). Sueros controles positivos y negativos empleados en las reacciones provinieron de la seroteca del estudio realizado por Piranda y col., (2008). Los conjugados utilizados en las diluciones fueron los siguientes: para los sueros de caninos se utilizó Anti-IgG de *Canis familiaris* marcado con Isotiocianato de Fluoresceína, SIGMA®, en una dilución de 1:1000. Para *S. tumidus* se empleó Anti-IgG de *Rattus norvegicus* marcado con Isotiocianato de Fluoresceína, SIGMA®, en una dilución de 1:400. Para los sueros obtenidos de *O. nasutus*, se usó Anti-IgG de ratón, marcado con Isotiocianato de Fluoresceína, SIGMA®, a una dilución de 1:400.

Cuando se observó una reacción positiva en la dilución de Triagem (screening), 1:64, los sueros se testaron nuevamente por IFI, con el objetivo de determinar el título final de la reacción y adjudicar, en los casos posibles, la especie de *rickettsia* responsable de la respuesta inmune (Horta y col., 2004, 2007, Pena y col., 2009). Para las titulaciones, se partió de la misma dilución (1/64), y se procedió a realizar diluciones seriadas en PBS, hasta que la muestra de suero dejara de ser seroreactiva.

#### **Extracción de ADN de garrapatas**

Para la extracción del material genético de los ixódidos se empleó el Kit comercial: Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega; y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Se realizó extracción de ADN individual de un total de 166 garrapatas de 4 especies. Los detalles se presentan en la Tabla 4.

#### **Cuantificación y determinación de la pureza del ADN extraído**

Las extracciones de ADN de garrapatas fueron analizadas mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo®, para determinar la concentración de la muestra extraída y la pureza de la misma. Para esto

último se utilizó la relación de absorbancia a las longitudes de onda 260/280 nm.

### **Análisis molecular de garrapatas en busca de ADN de *Rickettsia* spp.**

Con el objetivo de determinar la presencia de ADN rickettsial en las garrapatas sometidas a extracción de ADN, se realizó la técnica de PCR convencional, con primers que amplifican la región codificante para la enzima citrato sintasa (gen *gltA*). Este gen está presente en todas las especies de rickettsia por lo que es indicador de que existe en la muestra ADN de *Rickettsia* spp.

Los primers que se emplearon para el presente estudio fueron CS-78 y CS-323, como se muestra en la Tabla 2; los que amplifican un fragmento génico de 401 pb.

**Tabla 2.** Primers empleados en las reacciones de PCR.

Gen y primers	Especificidad de la PCR	Secuencia de los primers (5' > 3')	Referencia
<i>gltA</i>  CS-78  CS-323	<i>Rickettsia</i> spp.	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT  AGGGTCTTCGTGCATTCTT	Labruna y col., 2004

<b><i>ompA</i></b>	SFG	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery col., 1991
Rr 190.70			
Rr 190.602		AGTGCAGCATTGCTCCCCCT	

### **Análisis molecular de garrapatas en busca de ADN de rickettsias pertenecientes al SFG**

Aquellas muestras de ADN que fueron positivas para la PCR anterior, es decir, que poseían ADN correspondiente a *Rickettsia* spp., fueron sometidas a una segunda PCR. Se emplearon los primers 190.70 y 190.602, que amplifican un fragmento del gen *ompA*, presente en todas las especies del género *Rickettsia* que pertenecen al grupo de las fiebres manchadas. Esta técnica se realizó de acuerdo a lo reportado por Regnery y col., (1991), realizando la amplificación de un fragmento del gen que posee 532 pb.

En ambas PCRs se empleó como control positivo ADN de *R. parkeri* cepa NOD, aislada de *A. nodosum*. Como control negativo se utilizó agua miliQ.

### **Electroforesis**

Los productos amplificados de las reacciones de PCR convencional para los genes *gtIA*, y *ompA* fueron visualizados con un equipo de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (100 ml TBE 0,5%; 1,5g agarose UltraPure™ Agarose



Invitrogen™), en cuba horizontal y tampón TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0), corrido a un voltaje de 1 a 5 V/cm durante 30 minutos. El revelado de la corrida electroforética se realizó empleando un colorante no tóxico, llamado Sybr safe®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Dicho colorante se mezcló con el gel de agarosa luego de la homogenización del mismo. Este colorante posee la misma sensibilidad que el Bromuro de Etidio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) y una toxicidad menor. A continuación de la corrida, se procedió a la lectura/observación del gel en una cámara oscura (Alphalmager®) que emite luz ultravioleta y un sistema de software que capta la imagen y la transfiere a una computadora. Las muestras que aparecieron como bandas a la misma altura que el control positivo se consideraron positivas.

Las muestras positivas se mandaron secuenciar en el Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia, da Faculdade de Veterinária e Zootecnia, da Universidade de Sao Paulo, SP, Brasil.

### **Análisis estadístico de los datos**

El análisis de los datos de IFI se realizó mediante test de Chi-cuadrado, y diferencias entre proporciones. Se trabajó siempre con un intervalo de confianza de 95%, por lo tanto un error  $\alpha$  de 5%.

Así, se determinó si existía relación entre distintas variables: seropositividad versus edad de los caninos; seropositividad versus localidad de colecta y seropositividad versus estación del año. Cuando se determinó la existencia de una relación, se procedió al análisis por diferencia de proporciones, con el fin de determinar cuál o cuáles de las categorías era/n la/s que presentaba/n diferencia significativa.

# RESULTADOS

## RESULTADOS

### **Determinación de la prevalencia de infección de *Rickettsia* spp. en caninos domésticos residentes en la zona endémica de rickettsiosis en Uruguay.**

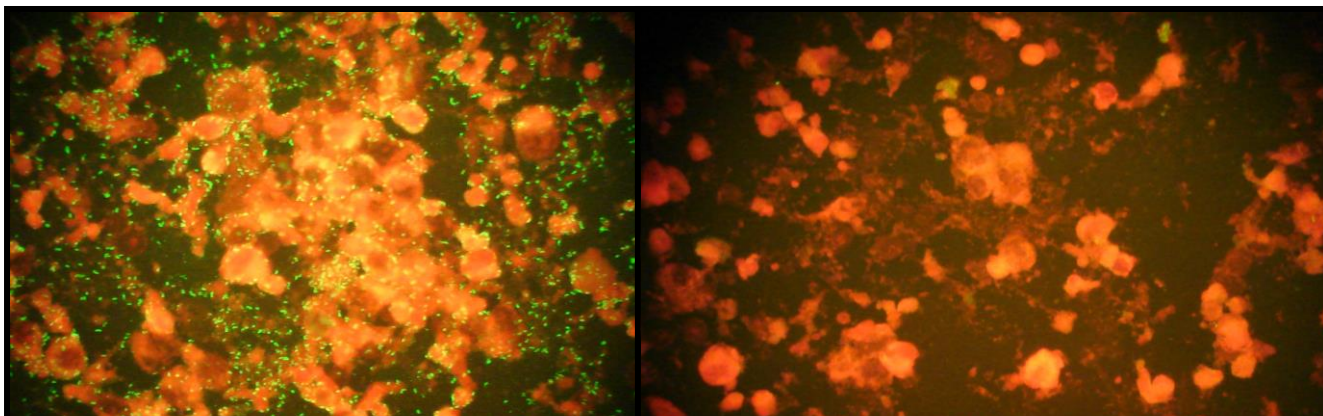
En el período comprendido entre Marzo de 2012 y Junio de 2013 se colectaron un total de 1547 muestras de sangre de caninos domésticos residentes en el área endémica de rickettsiosis en Uruguay, lo que permitió conformar una seroteca en el Dpto. de Parasitología Veterinaria, FVET/UdelaR.

Para el análisis serológico se trabajó con un total de 1000 sueros, correspondientes a todas las estaciones del año y a los 4 Departamentos estudiados.

Dichos sueros se procesaron por la técnica de IFI enfrentándose individualmente a antígenos de tres especies de *Rickettsia*: *R. rhipicephali*, *R. felis* y *R. parkeri*.

De los 1000 sueros analizados, 203 reaccionaron frente a al menos una especie de *Rickettsia*, por lo que la prevalencia de *Rickettsia* spp. fue de 20.3% en la población de estudio.

A su vez, es de notar que se observó seropositividad en animales en todas las estaciones del año y en todas las localidades analizadas y por lo tanto en los 4 Departamentos. En la figura 1 se muestra cómo se observa una lámina al microscopio de fluorescencia, a modo de ejemplo.



**Figura 1.** Lámina de IFI vista al microscopio de Fluorescencia. A La izquierda se observa una lámina correspondiente a un suero positivo (reactivo) y a la derecha, una lámina correspondiente a un suero negativo (no reactivo).

**Determinación de la/s especies del género *Rickettsia* responsables por la respuesta inmune en esos hospederos, y determinar la prevalencia de la/s misma/s.**

Para intentar determinar la especie de *Rickettsia* spp. responsable de la respuesta inmune celular presente en los animales, se llevó a cabo la titulación de todos los sueros seropositivos, tal como se explicó en la sección de Material y Métodos.

Así, se realizó la titulación mediante diluciones seriadas de los 203 sueros reactivos, pudiéndose adjudicar la especie de *Rickettsia* involucrada en la respuesta inmune en 140 de las 203 muestras seropositivas. En las restantes, los sueros no reaccionaron a una especie de patógeno particular con un título 4 veces mayor, por lo que no pudo sugerirse la especie implicada.

Los títulos determinados por IFI fueron muy diversos, estando

comprendidos en el rango de 64 a 32.768 en las 203 muestras analizadas.

Como se mencionó más arriba, en 140 de los 203 sueros (69%), fue posible mediante la titulación sugerir la especie de agente rickettsial con la que el perro estuvo en contacto. En todos ellos la especie de *Rickettsia* implicada fue *R. parkeri*, y por lo tanto dicha especie ha sido la única con la que los caninos de la población de estudio han estado en contacto.

Es así, que la prevalencia de *R. parkeri* en los perros analizados en este estudio es de al menos 14%, correspondiendo a 140 de los 1000 muestreados.

Los títulos para esta especie variaron desde 128 hasta 32.768, siendo este último valor considerablemente alto.

### **Relación entre la edad de los caninos y la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia*.**

Primeramente se categorizaron las edades de los caninos arbitrariamente, definiéndose 2 categorías, tomando como punto de corte la edad de un año:  $\leq 1$  año y  $> 1$  año. Se registró la edad de un total de 660 caninos, de los que 236 se ubicaban en la primer categoría y 424 en la segunda.

Mediante el análisis de Chi-cuadrado se analizó si existía una relación entre la seropositividad y la edad de los perros de los que provinieron los sueros testados, de acuerdo a las categorías antes mencionadas. Dicho análisis determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa

entre la proporción de seropositivos y los rangos etarios para un nivel de confianza de 95 %; indicando que hay una mayor proporción de positivos en la categoría de animales > a 1 año ( $p = 0.023$ ).

### **Relación entre la región donde viven los caninos y la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia*.**

Igual que en apartado anterior, el primer paso fue determinar las áreas con el objetivo de definir la variable. De esta forma se decidió realizar dos análisis independientes.

Por un lado se trabajó con cada uno de los Departamentos como área individual, con excepción de Canelones, el que se subdividió en dos zonas por la diferencia entre las mismas. Así, se definieron 5 áreas de trabajo, tal como sigue: Canelones interior, Canelones costa, Maldonado, Montevideo y Rocha. Paralelamente se realizó un análisis tomando Canelones como unidad, quedando entonces las áreas tal como los Departamentos: Canelones, Maldonado, Montevideo y Rocha.

En ambos casos se realizó el test de Chi-cuadrado, comparando la seropositividad respecto a las localidades. Las proporciones de seropositividad se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Número de caninos analizados en cada una de las áreas y proporción de seropositivos correspondientes.

Localidad	N° positivos	N° total	Proporción (+)
Canelones interior	97	415	23.4%
Canelones costa	26	172	15.1%
Canelones	123	587	21.0%
Maldonado	40	196	20.4%
Montevideo	9	76	11.8%
Rocha	31	141	22.0%

El análisis de Chi-cuadrado para determinar si existía una relación entre las zonas estudiadas y la presencia de anticuerpos en los animales demostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de animales seropositivos y los sitios de colecta, para un intervalo de confianza de 95 %. Sin embargo, cuando se toma al Dpto. de Canelones dividido en dos, el resultado es muy cercano al límite de significancia, lo que se traduce en una tendencia al acúmulo de seropositivos en Canelones interior. Asimismo, cuando se toma a dicho Dpto. como unidad, la proporción de seropositividad disminuye, sugiriendo un efecto diluyente de Canelones costa.

### **Relación entre la estación del año y la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia*.**

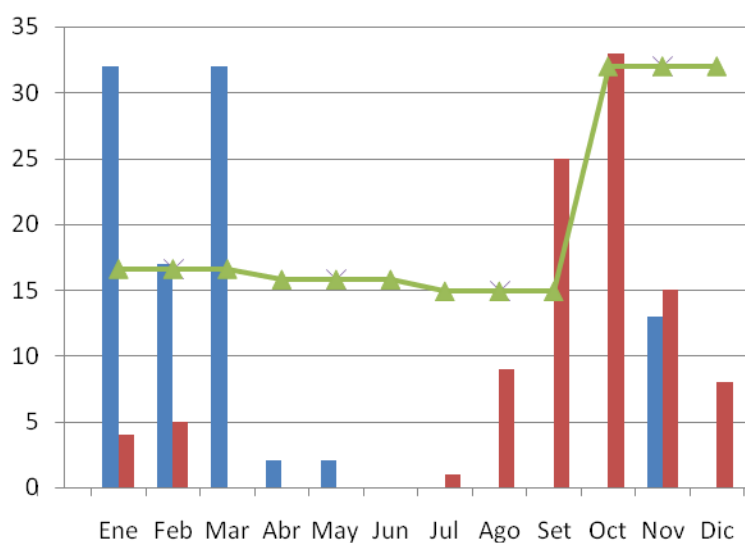
Los 1000 sueros analizados por IFI correspondían a perros cuya colecta de sangre se realizó en diferentes momentos del año. Así, se analizaron 289 muestras de verano, 222 de otoño, 214 de invierno, y 275 de primavera.



El análisis de Chi-cuadrado demostró que existe una diferencia entre la proporción de seropositivos en relación a la estación del año. Se observó un acúmulo de muestras seropositivos en la primavera ( $p < 0.001$ ); siendo las proporciones: 16.6% en verano, 15.8% en otoño, 14.9% en invierno y 32.0% en primavera.

### **Correlación de la dinámica de infección canina a lo largo de un año con respecto a la dinámica estacional de *Amblyomma triste*.**

Para esto se empleó la estacionalidad de *A. triste* determinada por Venzal y col., (2008), considerando paralelamente la proporción de caninos seropositivos en cada una de las estaciones del año. Así, se observa que el acúmulo de perros positivos, y por lo tanto una mayor proporción de seropositividad coincide con el pico estacional de los adultos de esta especie de garrapata, en primavera (ver Fig. 2); mientras que a lo largo del resto del año la proporción de animales seropositivos permanece relativamente constante, incluso durante el pico estacional de larvas y ninfas de *A. triste*.



**Figura 2.** Dinámica estacional de *A. triste* en Uruguay (Fuente: Venzal y col., 2008), y proporción de seropositivos a lo largo del año: **Azul**, inmaduros de *A. triste*; **Rojo**, adultos de *A. triste*; **Verde**, proporción de perros seropositivos (los 4 triángulos diferentes representan los promedios en cada estación del año).

### **Análisis de la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia* spp. en roedores de la zona endémica de rickettsiosis en Uruguay; especie implicada en dicha respuesta.**

En las 3 salidas de campo realizadas, se logró coleccionar únicamente 9 roedores. De ese total de animales, 5 fueron identificados como *Scapteromys tumidus*, uno como *Oxymycterus nasutus*, y los 3 restantes no pudieron ser identificados dadas las similitudes morfológicas entre especies.

De todos ellos, exceptuando uno de los que no se identificó, se coleccionó muestra de sangre, y se almacenó el suero.

Con respecto a la presencia de ixódidos en estos vertebrados, se observó en 3 de los 9 roedores, todos identificados como *S. tumidus*. Dos ejemplares de esta especie, coleccionados en la primer salida de campo

estaban parasitados por larvas, y principalmente ninfas de *A. triste* (n = 21). El otro ejemplar que presentó garrapatas, también correspondió a *S. tumidus*, y los ixódidos fueron identificados como *Ixodes longiscutatum* (n = 2).

De aquellos 8 roedores de los que se logró coleccionar sangre exitosamente, se realizó el análisis del suero por IFI, y al igual que en el caso de los caninos, los sueros fueron enfrentados a antígenos de 3 especies de rickettsias: *R. rhipicephali*, *R. felis*, y *R. parkeri*. La proporción de seropositividad fue de 25 % (2/8).

La titulación de esos dos sueros reaccionantes permitió identificar a *R. parkeri* como la especie de *Rickettsia* involucrada en la respuesta inmune en ambos casos; siendo los títulos de 512, y observándose reacción únicamente frente a los antígenos de esa especie de patógeno.

Los dos roedores que estuvieron en contacto con *R. parkeri*, corresponden a los dos individuos de la especie *S. tumidus* de la primer colecta, es decir aquellos que estaban parasitados por *A. triste* en el momento de la captura.

### **Determinación de la presencia de *Rickettsia* spp. del grupo de las fiebres manchadas en ejemplares de *A. triste* de ambiente y de hospedero colectados en el área endémica del Uruguay.**

Se coleccionaron un total de 166 ixódidos a lo largo del trabajo. Dichas garrapatas se distribuyen como sigue:

Colecta del ambiente. A través del uso de banderas, se colectaron 53 ejemplares adultos de garrapatas, identificados todos como pertenecientes a la especie *A. triste*.

Colecta de hospederos caninos. En las Jornadas de muestreo, se lograron coleccionar ixódidos paralelamente a la obtención de muestras de sangre. De esta forma se obtuvieron 85 garrapatas, pertenecientes a tres especies: *R. sanguineus*, *A. tigrinum* y *A. triste*.

Colecta de hospederos humanos. Solo se obtuvieron 3 ejemplares de garrapatas que parasitaron humanos; las tres identificadas como *A. triste*.

Colecta de hospederos roedores. A través de las 3 colectas de roedores, se obtuvieron 25 garrapatas, pertenecientes a dos especies diferentes: *A. triste* e *I. longiscutatum*.

Los detalles de las cantidades y estadios de los ixódidos colectados se muestran en la Tabla 4.

Luego de la extracción de ADN (ver Material y Métodos), cada muestra se sometió a PCR convencional, primeramente para determinar la presencia de ADN de *Rickettsia* spp. Para esto se amplificó un fragmento del gen que codifica para la enzima citrato sintasa, empleando los primers CS-78 y CS-323 (Labruna y col., 2004). Las condiciones de termociclado fueron las empleadas por los mismos autores.

De los 51 ejemplares de *R. sanguineus* procesados, todos fueron negativos, por lo cual ninguno de ellos presentó ADN de *Rickettsia* spp.

Por otra parte, de los 106 ejemplares de *A. triste* que se sometieron a esta PCR convencional, 9 (8.5%) exhibieron bandas en el gel de agarosa de 401 pb, a la altura del control positivo, considerándose entonces positivas y

por lo tanto, infectadas por rickettsiales del género *Rickettsia*. En la figura 3 se muestra un gel de electroforesis a modo de ejemplo. Los detalles del origen de estas garrapatas pueden observarse en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Ixódidos colectados en el presente trabajo. Análisis moleculares de los mismos.

Especie de garrapata y origen	N	estadio	N° CS2 +	N° ompA +	Secuenciamiento
<i>A. triste</i> – ambiente	53	53 A	3	3	<i>R. parkeri</i>
<i>A. triste</i> - canino	28	28 A	2	2	<i>R. parkeri</i>
<i>A. trsite</i> – humano	3	3 A	0	-	
<i>A. triste</i> - <i>S. tumidus</i>	22	22 N	4	3	<i>R. parkeri</i>
<i>A. tigrinum</i> - canino	6	6 A	4	4	<i>R. parkeri</i>
<i>R. sanguineus</i> - canino	51	21 N 30 A	0	-	
<i>I. longiscutatum</i> - <i>S. tumidus</i>	3	3 N	1	0	

Además de los ejemplares de *R. sanguineus* y *A. triste*, se sometieron a misma PCR, los ADNs extraídos de *A. tigrinum* e *I. longiscutatum*. Con respecto a la primer especie, de las 6 garrapatas procesadas, 4 (66.7%) poseían ADN de *Rickettsia* spp., mientras que de la segunda, de los tres analizados solamente uno se halló infectado por este género de agente rickettsial (ver Tabla 4).

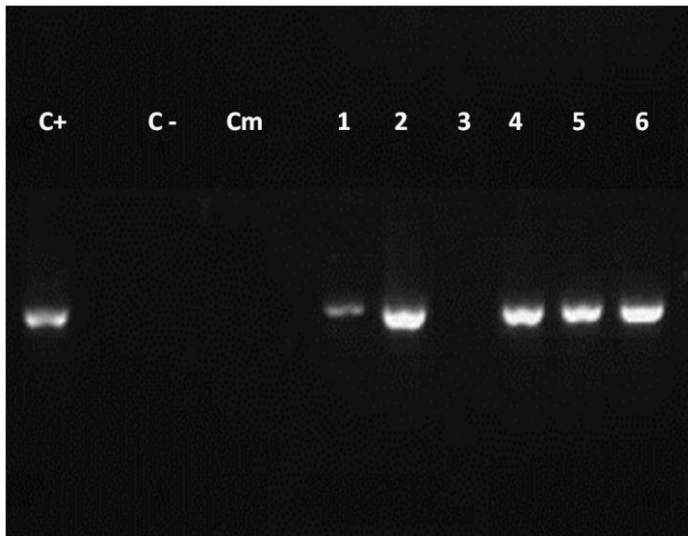
Todos aquellos ejemplares de ixódidos positivos en la PCR convencional para la enzima citrato sintasa, fueron sometidos a una segunda PCR, convencional también, que amplifica un fragmento mayor de ADN, de 532 pb, correspondiente al gen que codifica la proteína de membrana OmpA. Dicho gen, llamado *ompA*, solo se halla presente en las rickettsias del SFG. De las 14 muestras positivas a la primer PCR, 12 también fueron positivas a la segunda (*ompA*). En la figura 4 se muestra un gel de electroforesis a

modo de ejemplo.

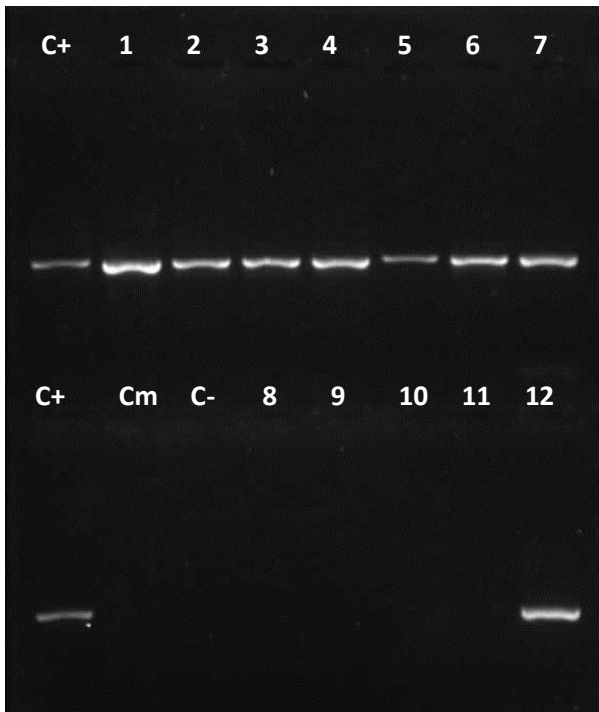
Por lo anterior, del total de 166 garrapatas analizadas en busca de material genético de *Rickettsia* spp., solamente 14 presentaron ADN blanco, de las cuales al menos 12 correspondían al grupo de las fiebres manchadas. Considerando las especies colectadas y analizadas, exceptuando *R. sanguineus*, las dos especies de *Amblyomma* y la especie de *Ixodes* se encontraron infectadas por ADN del género *Rickettsia*.

En el caso de *Amblyomma*, tanto *A. triste* como *A. tigrinum*, se determinó que la rickettsia en ellas presentes pertenecía al SFG, y al secuenciarse el ADN amplificado del gen *ompA*, perteneciente a un ejemplar de cada una de las especies, se logró identificar a nivel específico el material genético, como perteneciente a *R. parkeri*, con un 99% de similitud con EF102238 y otras secuencias (ejemplar de *A. triste* obtenido de roedor, *S. tumidus*) y un 100 % de similitud con KC003476 y otras secuencias (individuo de *A. tigrinum* obtenido de canino doméstico).

En el caso de *I. longiscutatum*, no se logró determinar la especie de *Rickettsia* presente en la misma.



**Figura 3.** Gel de electroforesis de Agarosa 1.5% Del gen *gltA*. **C+:** control positivo; **C-:** control negativo; **Cm:** control de la mix de PCR; **1-6:** muestras corridas.



**Figura 4.** Gel de electroforesis de Agarosa 1.5% Del gen *ompA*. **C+:** control positivo; **C-:** control negativo; **Cm:** control de la mix de PCR; **1-12:** muestras corridas.

# DISCUSIÓN

Perspectivas y conclusiones



## DISCUSIÓN

A partir de la presente investigación fue posible determinar la prevalencia de *Rickettsia* spp. en la población de estudio, conformada por 1000 caninos domésticos residentes en el área endémica de rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en el territorio uruguayo, siendo la misma de 20.3 %. Si bien este valor no es despreciable en lo absoluto, tampoco alcanzó los valores que podrían esperarse. Con esto último hago referencia al relevamiento serológico geográfico más cercano, llevado a cabo en el sur de Río Grande do Sul en Brasil, realizado por Saito y col., (2008), quienes obtuvieron una frecuencia de ocurrencia de 42.4%.

De la misma forma, nuestro trabajo evidenció una prevalencia de 14% para *R. parkeri*, mientras que el trabajo de los investigadores antes mencionados demostró una frecuencia de ocurrencia de 25.7%. Las diferencias observadas entre el presente trabajo y aquel realizado por Saito y col., (2008), posiblemente se deban a que este último tuvo como target una población de caninos residentes en áreas rurales, mientras que nuestra investigación se realizó principalmente en áreas urbanas y suburbanas, y en menor medida en zonas rurales. De acuerdo a la distribución del vector, es esperable que la prevalencia sea mayor en

zonas rurales, no obstante, los valores obtenidos en áreas urbanas y suburbanas son en contraste, relativamente altos.

A su vez, la única especie de *Rickettsia* cuya presencia se determinó fue *R. parkeri*, resultado que coincide con los análisis moleculares de garrapatas realizados previamente a nivel nacional (Venzal y col., 2004; Venzal y col., 2008a), por lo que es factible que el 20.3% de caninos domésticos seroreactivos correspondieran a 203 animales que habían tenido contacto con dicha especie de agente rickettsial, solamente que los títulos de 63 de dichos caninos no fueron lo suficientemente altos para lograr adjudicar la especie. Con esto último me refiero a que, o bien tuvieron un título de 64 o reaccionaron frente a más de un antígeno pero a ninguno con al menos un título 4 veces mayor. Independiente de las consideraciones hasta aquí mencionadas, este es el primer trabajo que desarrolla un relevamiento serológico en una población de perros que viven en el área endémica de nuestro país, por lo que los valores obtenidos constituyen una referencia cuantitativa de ahora en más.

De acuerdo a los resultados, *R. parkeri* es la única especie del género circulando y establecida en el área, ya que como fue mencionado, no se determinó ningún individuo cuya respuesta inmune se adjudicara al contacto previo con las especies a las que correspondían los restantes

antígenos testados. Sin embargo, no se puede ignorar el hecho de que muchos sueros reaccionaron frente a más de un antígeno, aunque se deba a la clásica reacción cruzada. Detallando: 92 sueros reaccionaron solo frente a *R. parkeri*, 78 reaccionaron a *R. parkeri* y *R. rhipicephali*, 30 reaccionaron frente a los 3 antígenos *R. parkeri*, *R. rhipicephali* y *R. felis*, y solamente 3 sueros a *R. parkeri* y *R. felis*. Tal como se aprecia, si bien hay sueros que reaccionaron con más de una especie, ningún suero reaccionó a otra especie sin reaccionar frente a *R. parkeri*.

Como se mencionó en la sección anterior, caninos seroreactivos frente a la especie en cuestión fueron hallados en los 4 Departamentos estudiados y a lo largo de todas las estaciones del año. Con respecto a la magnitud de la respuesta observada frente a *R. parkeri*, el rango de los títulos es amplio, cuyo mínimo y máximo es 128 y 32.768 respectivamente; y siendo el título más frecuente o moda, 512, presente en 38 de los 140 animales. Es de resaltar que los dos individuos con mayor título, uno con 16.384 y otro con 32.768 residían en áreas rurales. Inclusive, si nos referimos a la población rural estudiada, que corresponde a 88 de los 1000 caninos, la prevalencia de *Rickettsia* es de 30.7%, y la de *R. parkeri* es de 28.4%, manteniéndose el rango de títulos presentado para la población blanco original.

El análisis de las características de la población canina, como ser edad, área de residencia y estación del año, dejó en evidencia aspectos interesantes con respecto a la epidemiología de esta enfermedad en el Uruguay. En primer lugar, se evidenció que los caninos mayores a 1 año presentan una proporción de seropositividad mayor a aquellos comprendidos en la franja etárea menores a 1 año. Esta conclusión es de esperarse dado que aquellos caninos mayores a un año, expuestos a una generación de garrapatas anual, tuvieron más chance de infectarse, e incluso reinfectarse, debido a repetidas exposiciones a ejemplares de *A. triste*. A su vez, teniendo en cuenta que los anticuerpos pueden mantenerse por períodos de hasta 3 años (Breitschwerdt y col., 1988), es lógico pensar que en individuos mayores la presencia de anticuerpos sea en una proporción mayor, ya que estaremos considerando no sólo aquellos animales que tuvieron una única oportunidad de infectarse, sino aquellos que estuvieron expuestos a más de una generación de adultos, por lo tanto con varias oportunidades de sufrir contacto con el agente, y detectar esta respuesta hasta 3 años después de sucedida. Al realizarse el análisis estadístico correspondiente a las localidades de colecta versus la proporción de seroreactivos, tanto en el que se divide en 4 como en 5 zonas no hay diferencias significativas. Sin embargo, la tendencia al

acúmulo de seropositivos en Canelones interior, que puede observarse en las proporciones calculadas, es apoyada estadísticamente por la cercanía al valor de significancia. Las proporciones individuales muestran que para Montevideo, la proporción de seropositivos a *Rickettsia* spp. es 11.9%, mientras que para Canelones, Maldonado y Rocha está entre 20.4 y 22 %; por lo que estos últimos Departamentos tienen valores muy similares entre sí y mayores al primero. Ahora, al separar Canelones en dos por las características físicas de las áreas, vemos que Canelones interior revela una proporción de 23.4% y Canelones costa de 15.1%. De esta forma se aprecia un efecto de dilución que ejerce el segundo sobre el primero cuando se contrasta frente al global. Es más, parecería que Canelones costa es más similar a Montevideo que a Canelones interior a este respecto.

En relación a la dinámica estacional, la proporción de caninos seropositivos en verano, otoño e invierno es similar, variando entre 14.9% y 16.6%; con un pico en primavera del 32%, quedando así establecido un claro acúmulo de perros seropositivos en dicha estación, coincidiendo con el pico estacional de los adultos de *A. triste*, estadio que parasita a los caninos. El hecho de observar una proporción mayor en ese período del año posiblemente se deba a que hay un efecto aditivo; o sea, a la

proporción de seropositivos que se mantiene en la población en las 3 estaciones restantes del año se le suman las nuevas infecciones, provenientes de la generación de garrapatas adultas del mismo año. A su vez, en la primavera se observa un aumento de los casos clínicos humanos, tal como ha sido reportado por Conti-Díaz y col., (2009) y Venzal (2013). En la primavera entonces ocurre el pico estacional de adultos del vector, un aumento en la proporción de caninos seropositivos así como un aumento en la cantidad de casos clínicos humanos.

Respecto a los hospederos de las larvas y ninfas de *A. triste*, solo se logró colectar sangre de 8 animales. Sin embargo, la proporción de seropositivos para *Rickettsia* spp. fue de 25%, la que se corresponde con la de *R. parkeri*, ya que los sueros de los roedores solamente reaccionaron frente a dicha especie, con títulos de 512, por lo que se sugiere que la respuesta inmunitaria es resultado de contacto previo con *R. parkeri*. Estos pequeños mamíferos correspondieron a ejemplares de *S. tumidus*, por lo que sería importante realizar un estudio mayor respecto a esta especie, ya que podría tener importancia en la dinámica de la enfermedad, infectando a distintos estadios de la garrapata, posibilitando que a través de la transmisión transtadial del patógeno alcance al estadio adulto e infecte posteriormente a los caninos domésticos y al hombre.

Recientemente se ha demostrado que *R. parkeri* ejerce un efecto deletéreo en ninfas ingurgitadas de *A. triste*, por lo que se sugiere que si bien la propia garrapata oficia como hospedero reservorio natural para el patógeno en cuestión, sería necesaria la presencia de un vertebrado como amplificador de la enfermedad para el mantenimiento a largo plazo (Nieri-Bastos y col., 2013). De acuerdo a nuestros resultados, sugerimos que el canino doméstico puede tener el rol de hospedero amplificador, siendo consecuentemente un actor importante en la epidemiología de la rickettsiosis por *R. parkeri* en el área endémica del Uruguay. El estatus serológico de los perros es una fuerte evidencia del establecimiento de la enfermedad en el sur del país, y que tuvo como origen la adaptación de la garrapata vector a estos hospedadores, ya que como se ha mencionado anteriormente y tal como reporta Venzal (2013), los hospedadores naturales iniciales de *A. triste* en el territorio uruguayo se encuentran en muy baja densidad o incluso ausentes. Así, el canino ocupó el lugar de los vertebrados a los que se hace referencia; y no sólo eso sino que es susceptible a la infección por *R. parkeri*, generando una respuesta inmunitaria, pero sin presentar signos o síntomas clínicos, aún con títulos altos. Justamente por esto último, es que la rickettsiosis no tiene hasta el momento relevancia en la clínica de pequeños animales y por lo tanto no

se realiza ningún tipo de diagnóstico en este tipo de animales. De todas formas creo sería útil emplearlo como indicador del riesgo de infección humana en las zonas ubicadas dentro del área endémica como método de vigilancia; de forma similar a lo propuesto por diversos autores, por ejemplo para el caso del dúo equinos/*A. cajennense* (Pinter y col., 2008).

A lo largo del trabajo se colectaron 166 garrapatas, correspondientes a 4 especies y siendo de distintos orígenes según y de acuerdo al estadio de la especie en cuestión (ver Tabla 4).

A partir de los análisis moleculares de los ejemplares por PCR empleando primers para la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la enzima citrato sintasa, se obtuvieron 14 garrapatas positivas, por lo tanto infectadas con *Rickettsia* spp. Luego de someter el ADN extraído de estos ejemplares a una segunda PCR, que amplifica un fragmento del gen codificante para *ompA*, 12 dieron positivo nuevamente, por lo que se determinó así que estaban infectados por rickettsias del SFG. Tras el secuenciamiento de dichos productos, solamente se logró con éxito el del ADN correspondiente a dos ejemplares, uno perteneciente a la especie *A. triste*, y el otro a *A. tigrinum*. En ambos casos la especie de rickettsia involucrada fue *R. parkeri*. Este resultado, si bien corresponde únicamente a dos ixódidos, permite demostrar que este agente continúa circulando en



el área endémica, y que estaba presente en la naturaleza durante la actual investigación.

Vale la pena mencionar que, los dos *S. tumidus* cuyas IFIs presentaron títulos de 512 estaban parasitados por *A. triste*, y uno de ellos además por *I. longiscutatum*. Cuando se realizaron las PCRs de las garrapatas obtenidas de ellos, se determinó la presencia de ADN de rickettsias del SFG en el caso de *A. triste* de ambos roedores, mientras que no se determinó la presencia del material genético del género *Rickettsia* en el ejemplar de *I. longiscutatum* que estaba parasitando al roedor.

También es importante enfatizar que se hallaron individuos correspondientes a *A. tigrinum* infectados por *Rickettsia* spp. pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas (4/6). De las 4 garrapatas, tres fueron colectadas de un canino de San Jacinto, Canelones interior, que fue seropositivo, y cuyo título permitió sugerir que la especie de patógeno con la que estuvo en contacto previamente fue *R. parkeri*. Si bien no fue posible el secuenciamiento del producto amplificado por PCR, es posible que la rickettsia presente en esta especie de ectoparásito fuera *R. parkeri*. El otro ejemplar de *A. tigrinum* PCR + correspondió a un ejemplar hembra, teleógina, colectada de un perro en Salamanca,

Maldonado. Así, se determinaron individuos de *A. tigrinum* infectados probablemente por *R. parkeri* en dos Departamentos del sur del país.

La presencia de *R. parkeri* en *A. tigrinum* ya ha sido descrita en Bolivia (Tomassone y col., 2010b, y se sugiere que esta especie de garrapata, así como otras pertenecientes también al grupo maculatum, podrían tener un rol en el ciclo biológico de *R. parkeri*. Nuestro hallazgo permite concordar con lo mencionado por dichos autores. A su vez, en áreas predominantemente rurales del sur de Uruguay hay una coexistencia de *A. triste* y *A. tigrinum*, las que parasitan en su estadio adulto a caninos domésticos muy frecuentemente, por lo que el hecho de hallar ejemplares de la segunda especie infectados por este patógeno es altamente probable, y puede deberse simplemente a la coinfección por ambas especies en los mismos perros (Szabó y col., 2013). También podría deberse únicamente a la alimentación del ixódido en caninos infectados (sin tener necesariamente que ver con parasitismo en conjunto con *A. triste*), por lo que es necesario realizar estudios con el fin de dilucidar el rol de *A. tigrinum* en la epidemiología de la rickettsiosis por *R. parkeri*, tanto con respecto a su posible transmisión al ser humano como la dinámica de la propia rickettsia en los diferentes estadios del invertebrado.

Dada la proximidad entre las dos especies de garrapatas en cuestión es probable que, al igual que *A. triste*, *A. tigrinum* sea un vector competente para esta especie de *Rickettsia* spp. Estudios a este respecto son muy importantes, dado que un segundo vector para esta enfermedad puede ser relevante, y más en el caso de *A. tigrinum*, cuya distribución es bastante más amplia que la de *A. triste*. Si bien su comportamiento no es tan agresivo como en el caso de *A. triste*, que es la especie de garrapata que por excelencia pica a humanos en el sur de Uruguay, ya ha sido reportada parasitando a seres humanos (Venzal y col., 2003a, 2003d), por lo que si fuera un vector competente, podría como consecuencia ampliar la distribución geográfica del patógeno más allá del área endémica conocida.

Para terminar, me gustaría resaltar que nos estamos refiriendo a parásitos epidemiológicamente cruciales en la dinámica de la enfermedad, estratégicos, agresivos y con una impresionante capacidad de adaptación, por lo que representan un desafío sustancial respecto al control y prevención. Como consecuencia de su éxito de adaptación al perro como hospedero para los adultos en su ciclo trifásico, y dada la relación estrecha perro/hombre, el riesgo de infección del ser humano es mayor. Esto, en conjunto con los cambios en las áreas de predilección por las garrapatas,

principalmente la antropización como mencioné anteriormente, facilitan la interconexión entre los componentes de la tríada epidemiológica, y como resultado, permiten y favorecen el éxito de los parásitos y los patógenos por ellos transmitidos. Así, si finalmente se determinara que otras especies de ectoparásitos pueden actuar como vectores, como puede ser el caso de *A. tigrinum*, el escenario puede complicarse aún más.

No se puede perder del centro de atención que estamos frente a una zoonosis, y por lo tanto el profesional Veterinario es la primera línea de contención frente a la enfermedad. Si bien la rickettsiosis por *R. parkeri* es una enfermedad no letal, su tratamiento es sencillo en caso de diagnosticarse a tiempo, por lo que un diagnóstico a nivel humano es necesario. Esto lamentablemente raramente ocurre, principalmente por la escasez de conocimiento por parte de los médicos profesionales respecto a la enfermedad, sumado al hecho de que no existe un diagnóstico serológico adecuado a disposición de los mismos. Sin embargo, la realidad es que hay casos clínicos todos los años, y por lo tanto, debería ser un diagnóstico a tenerse en cuenta a partir de los signos y síntomas de los pacientes; considerando además la epidemiología de la enfermedad.

Creo que en estos casos epidemiológicamente complejos y sin un diagnóstico rutinario instaurado, el trabajo interdisciplinario de varios

profesionales es la clave para lograr al menos el tratamiento y control del patógeno, y luego focalizarse en la prevención, que es un desafío mayor.

Finalmente quiero expresar que tal como la esencia de la ciencia, las preguntas respondidas han dejado nuevas preguntas por responder.

## PERSPECTIVAS

En primer lugar confío en que la realización de un trabajo en poblaciones rurales, abarcando un área diferente en cuanto a sus características geográficas, puede aportar información complementaria a la generada en esta investigación; inclusive por el modo en el que viven y son empleados los caninos domésticos, los que muchas veces son empleados para trabajo de campo, compañeros de caza, accediendo a zonas con mayor población de garrapatas. A su vez, en estas áreas comienza también a aumentar la densidad de otras especies de ixódidos, como ser *A. tigrinum* y *A. aureolatum*, por lo que considero que esto debería no solo tenerse en cuenta, sino que merece un estudio profundo de forma independiente. Me refiero principalmente a dilucidar si esas otras especies tienen capacidad vectorial, y si así fuera, determinar la importancia en la epidemiología, tomando en cuenta su amplia distribución en el territorio nacional.

También es de crucial importancia que se establezca un diagnóstico de rutina a nivel humano dados los casos clínicos que se repiten cada año. Esto debe acompañarse, e ir preferentemente precedido por una difusión de información, de modo que sea un diferencial tomado en cuenta por los profesionales de la salud pública.

A su vez, el emplear el diagnóstico serológico en caninos como base para determinar zonas de riesgo es una potencial herramienta de vigilancia epidemiológica. Una vez más, queda sentada, la necesidad de colaboración y trabajo paralelo de diferentes profesionales.

Considero también importante realizar un trabajo sobre las poblaciones de roedores silvestres, que hospedan tanto a larvas como a ninfas de *A. triste* y que han estado en contacto con *R. parkeri* (como ha sido evidenciado por IFI), y que por lo tanto son actores importantes. Es necesario definir el rol de los mismos, si hay especies que sean epidemiológicamente más importantes, como es posible sea el caso de *S. tumidus* al menos en Maldonado.

## CONCLUSIONES

- Se determinó una prevalencia de *Rickettsia* spp. de 20.3% en la población canina objeto de estudio.
- Se identificó a *R. parkeri* como única especie de agente rickettsial responsable de las respuestas inmunes evidenciadas en los caninos, con una prevalencia de 14%.
- Se logró determinar que los perros mayores a 1 año de edad presentan una mayor proporción de individuos seropositivos respecto a los menores de 1 año de edad.
- Si bien no se observó diferencias estadísticamente significativas entre las localidades y la proporción de perros seroreactivos, se observó una tendencia al acúmulo de seropositivos en Canelones interior, tendencia apoyada por la cercanía al nivel de significancia.
- Se logró determinar un claro aumento en la proporción de animales seropositivos en la primavera. Este pico primaveral coincide con el pico poblacional de adultos de *A. triste*, por lo que se correlaciona la dinámica del vector el estadio en el que parasita a caninos, con la proporción de seropositivos en dichos hospederos.



- Se determinó la presencia de anticuerpos anti-*Rickettsia* spp. en el 25% de los roedores, y se identificó como posible patógeno causal de la respuesta a *R. parkeri*. Los roedores positivos correspondieron a la especie *S. tumidus*.
- Fue posible detectar ADN de *Rickettsia* spp. en tres especies de garrapatas: *A. triste*, *A. tigrinum*, e *I. longiscutatum*. En el caso de *A. triste*, fueron rickettsias pertenecientes al SFG, y correspondieron a ejemplares colectados tanto de ambiente como de caninos domésticos y de roedores. El ADN secuenciado se identificó como perteneciente a *R. parkeri*.
- Se determinó en ejemplares de *A. tigrinum*, por primera vez, la presencia de ADN de *R. parkeri*, también perteneciente a las rickettsias del SFG.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Anaya, E. 2004.** Prevencao e controle das rickettsioses no Peru. In Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas Américas. Relatório final: 40–43. Organizacao Pan-Americana da Saúde. Rio de Janeiro, Brazil.

**Andersson, S. G; Zomorodipour, A; Andersson, J. O; Sicheritz-Ponten, T; Alsmark, U. C; Podowski, R. M; Naslund, A. K; Eriksson, A. S; Winkler, H. H. y Kurland, C. G. 1998.** The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria: *Nature*, 396(6707): 133-140.

**Aragão, H.B. 1936.** Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 31: 759-844.

**Beati L. y Keirans J.E. 2001.** Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J. Parasitol.*, 87:32-48.

**Beugnet, F. y Marie, J.L. 2009.** Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.*, 163: 298–305.

**Black, W.C; Klompen, J.S; Keirans, J.E. 1997.** Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae:Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 7:129-44.

**Blanc, G.; Ogata, H.; Robert, C.; Audic, S.; Suhre, K.; Vestris, G.; Claverie J. y Raoult, D. 2007.** Reductive Genome Evolution from the Mother of *Rickettsia*. *PLoS Genetics*. 3(1): 0103-0114.

**Boero, J.J. 1944.** Notas Ixodológicas. I. *Ixodes longiscutatum*, nueva especie. II. Nueva lista de los ixodideos argentinos y sus huéspedes. *Rev. Asoc. Méd. Arg.*, 58: 353-355.

**Boero, J.J. 1957.** Las Garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea), Departamento Editorial, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 113 pp.

**Bowman, D.; Little, S.E.; Lorentzen, L.; Shields, J.; Sullivan, M.P.; Carlin, E.P. 2009.** Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Vet. Parasitol.*, 160: 138–148.

**Breitschwerdt, E.B.; Walker, D.H.; Levy, M.G.; Burgdorfer, W.; Corbett, T.; Hurlbert, S.A.; Stebbins, M.E.; Curtis, B.C.; Allen, D.A. 1988.** Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. *Am. J. Vet. Res.*, 49(1): 70-76.

**Cabrera, A.L. y Willink, A. 1973.** Biogeografía de América Latina. Serie de Biología. Monografía N° 13, Secretaría General de los Estados Americanos. Washington, D.C. 120 pp.

**Calzada, V. 1935.** Sobre *Rhipicephalus sanguineus*. *Rev. Med. Vet. Uruguay*. 35: 308.

**Cardwell, M. M. y Martinez, J. J. 2009.** The Sca2 autotransporter protein from *Rickettsia conorii* is sufficient to mediate adherence to and invasion of cultured mammalian cells: *Infect. Immun.*, 77(12): 5272-5280.

**Chapman, A.S. Murphy, S.M.; Demma, I.J.; Holman, R.C.; Curns, A.T.; MCQuiston, J.H.; Krebs, J.W.; Swerdlow, D.L. 2006.** Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1997–2002. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 6: 170–178.

**Chebataroff, J. 1951.** Rasgos geomorfológicos del territorio uruguayo. *Rev. Uruguay Geog. (Montevideo)*. 2: 5-28.

**Chebataroff, J. 1955.** Evolución del relieve del Uruguay y de Rio Grande do Sul. *Rev. Uruguay Geog. (Montevideo)*. 8: 39-96.

**Cicuttin, G. y Nava, S. 2013.** Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 108(1): 123-125.

**Conti-Díaz, I.A. 2001.** Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. Rev. Med. Uruguay. 17: 119-124.

**Conti-Díaz, I.A. 2003.** Rickettsiosis caused by *Rickettsia conorii* in Uruguay. Ann. N. Y. Acad. Sci., 990: 264-266.

**Conti-Díaz, I.A; Rubio, I; Somma Moreira, R.E; Pérez Bórmida, G. 1990.** Rickettsiosis cutáneo ganglionar por *Rickettsia conorii* en el Uruguay. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 32: 313-318.

**Conti-Díaz, I.A; Moraes-Filho, J; Pacheco, R.C; Labruna, M.B. 2009.** Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 51: 337-339.

**Crampton, A; McKay, I; Barker, S.C. 1996.** Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. Int. J. Parasitol., 26:511-7.

**Dantas-Torres, F. 2008.** The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Vet. Parasitol., 152: 173–185.

**D.G.S.V/Sanidad Animal Proyecto BID. 1994.** Epidemiología y campaña sanitaria, Garrapata. MGAP. 59 pp.

**Doolittle, R.F. y Feng, D.F. 1987.** Reconstructing the evolution of vertebrate blood coagulation from a consideration of the amino acid sequences of clotting proteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52: 869-74.

**Dumler, J.S. y Walker, D.H. 2005.** Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. N. Engl. J. Med., 353: 551–553.

**Eremeeva, M.E.; Dasch, G.A. y Silverman, D.J. 2001.** Quantitative Analyses of Variations In The Injury Of Endothelial cells elicited by 11 isolates of *Rickettsia rickettsii*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8(4):788–796.

**Estrada-Peña, A; Venzal, J.M; Mangold, A.J; Cafrune, M.M; Guglielmone, A.A. 2005.** The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae):

Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. *Syst. Parasitol.*, 60: 99-112.

**Estripeaut, D.; Aramburú, M.G.; Sáez-Llorens, X.; Thompson, H.A.; Dasch, G.A.; Paddock, C.D.; Zaki, S.; Ereemeeva, M.E. 2007.** Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1763–1765.

**Foley, J.E.; Brown, R.N.; Gabriel, M.W.; Henn, J.; Drazenovich, N.; Kasten, R.; Green, S.L; Chomel, B.B. 2007.** Spatial analysis of the exposure of dogs in rural north-coastal California to vector-borne pathogens. *Vet. Rec.*, 161: 653–657.

**Fournier, P. y Raoult, D. 2009.** Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1166: 1–11.

**Gillespie, J.J.; Beier, M.S.; Rahman, M.S.; Ammerman, N.C.; Shallom, J.M.; Purkayastha, A.; Sobral, B.S. y Azad, A.F. 2007.** Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. *PLoS ONE*, 2(3): 1-17.

**Goddard, J. 1997.** Clustering effects of lone star ticks in nature: implications for control. *J. Environ. Hlth.*, 59: 8-11.

**Grasperge, B.J.; Wolfson, W.; Macaluso, K.R. 2012.** *Rickettsia parkeri* infection in domestic dogs, southern Louisiana, USA, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(6): 995-997.

**Greene, C.E. y Breitschwerdt, E.B. 2006.** Rocky Mountain spotted fever, murine typhus like disease, rickettsialpox, typhus, and Q fever. Green CE, ed. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis: Saunders-Elsevier, 232 – 245.

**Greig, B. y Armstrong, P.J. 2006.** Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3rd ed) (Greene, C.E., ed.), pp. 219–224, Saunders Elsevier.

**Guglielmone, A.A.; Beati, L.; Barros-Battesti, D.M.; Labruna, M.B.; Nava, S.; Venzal, J.M.; Mangold, A.J.; Szabó, M.P.J.; Martins, J.R.; González-Acuña, D.; Estrada-Peña, A. 2006.** Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp. Appl. Acarol.*, 40: 83-100.

**Guglielmone, A.; Robbins, R.; Apanaskevich, D.; Petney, T.; Estrada-Peña, A.; Horak, I.; Shao, R. y Barker, S. 2010.** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2528: 1-28.

**Guimarães, J.H.; Tucci, E.D.; Barros Battesti, D.M. 2001.** Ectoparasitos de importancia veterinaria. Pleiade-FAPESP, São Paulo. 218 pp.

**Hechemy, K.E.; Raoult, D.; Eisemann, C.; Han, Y.S.; Fox, J.A. 1986.** Detection of antibodies to *Rickettsia conorii* with a latex agglutination test in patients with Mediterranean spotted fever. *J. Infect. Dis.*, 153: 132-135.

**Hidalgo, M. Salguero, E.; de la Ossa, A.; Sánchez, R.; Vesga, J.F.; Orejuela, L.; Valbuena, G. 2008.** Murine typhus in Caldas, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78: 321–322.

**Hinrichsen, V.L.; Whitworth, U.G.; Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C. y Mather, T.N. 2001.** Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218(7): 1092-1097.

**Horta, M.C.; Labruna, M.B.; Sangioni, L.A.; Vianna, M.C.B.; Gennari, S.M.; Galvao, M.A.M.; Mafra, C.L.; Vidotto, O.; Schumaker, T.T.S.; Walker, D.H. 2004.** Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the State of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(1), 2004, pp. 93–97.

**Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TT. 2007.** *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102:793-801.

**Hun, L.; Troyo, A.; Taylor, L.; Barbieri, A.M.; Labruna, M.B. 2011.** First Report of the Isolation and Molecular Characterization of *Rickettsia amblyommii* and *Rickettsia felis* in Central America. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10: 1395-7.

**Jado, I.; Oteo, J.A.; Aldámiz, M.; Gil, H.; Escudero, R.; Ibarra, V. Portu, J.; Portillo, A.; Lezaun, M.J.; García-Amil, C.; Rodríguez-Moreno, I.; Anda, P. 2007.** *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1405-1407.

**Jiang, J.; Chan, T.; Temenek, J.J.; Dasch, G.A.; Ching, W. y Richards A.L. 2004.** Development of a Quantitative Real time Polymerase Chain Reaction Assay Specific for *Orientia tsutsugamushi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(4): 351-356

**Jongejan, F. y Uilenberg, G. 2004.** The global importance of ticks. *Parasitology*. 129:S3-S14.

**Kaplan, J.E. y Schonberger, L.B. 1986.** The Sensitivity of Various Serologic Tests in the Diagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever. *J. Trop. Med. Hyg.*, 35(4): 840-844.

**Kohls, G.M. 1956.** Concerning the identity of *Amblyomma maculatum*, *A. tigrinum*, *A. triste* y *A. ovatum* of Koch, 1844. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 58: 143-147.

**La Scola, B. y Raoult, D. 1996.** Diagnosis of Mediterranean Spotted Fever by Cultivation of *Rickettsia conorii* from Blood and Skin Samples Using the Centrifugation-Shell Vial Technique and by Detection of *R. conorii* in Circulating Endothelial Cells: a Six-Year Follow-Up. *J. Clin. Microbiol.*, 34(11): 2722-2727.

**La Scola, B. y Raoult, D. 1997.** Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2715-2727.

**Labruna, M.B. 2009.** Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1166:156-166.

**Labruna, M.B.; Whitworth, T.; Horta, M.C.; Bouyer, D.H.; McBride, J.W.; Pinter, A.; Popov, V.; Gennari, S.M.; Walker, D.H. 2004.** *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.*, 42:90-98.



**Labruna, M.B.; Pacheco, R.C.; Nava, S.; Brandão, P.E.; Richtzenhain, L.J.; Guglielmo A.A. 2007a.** Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* Ticks from Argentina. *Microb. Ecol.*, 54: 126-133.

**Labruna, M.B.; Pacheco, R.C.; Richtzenhain, L.J.; Szabó, M.P.J. 2007b.** Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 869-873.

**Labruna, M.B. Ogrzewalska, M.; Moraes-Filho, J.; Lepe, P.; Gallegos, J.L.; López, J. 2007c.** *Rickettsia felis* in Chile. *Emerg. Infect. Dis.*, 13: 1794–1795.

**Labruna, M.B.; Mattar, S.V.; Nava, S.; Bermudez, S.; Venzal, J.M.; Dolz, G.; Abarca, K.; Romero, L.; de Sousa, R.; Oteo, J.; Zavala-Castro, J. 2011.** Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. MVZ Córdoba.* 16(2):2435-2457.

**Lackman, D.; Parker, R.; Geloff, R. 1949.** Serological characteristics of a pathogenic rickettsia occurring in *Amblyomma maculatum*. *Public Health Rep.*, 64: 1342–9.

**Lackman, D.B.; Bell, E.J.; Stoenner, H.G.; Pickens, E.G. 1965.** The Rocky Mountain spotted fever group rickettsias. *Health Lab.*, 2:135-141.

**Law, J.H.; Ribeiro, J.M.; Wells, M.A. 1992.** Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu. Rev. Biochem.*, 61: 87-111.

**Li, H. y Walker, D.H. 1998.** rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. *Microb. Pathog.*, 24(5): 289-298.

**Little, S.E.; Hostetler, J.; Kocan, K.M. 2007.** Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Vet Parasitol.*, 150(1–2): 139–145.

**Loretti, A.P. y Barros, S.S. 2005.** Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 134: 193-213.

**Márquez-Jiménez, F.J.; Hidalgo-Pontiveros, A.; Contreras-Chova, F.; Rodríguez-Liévana, J.J.; Muniain-Ezcurra, M.A. 2005.** Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enf. Infecc. y Microbiol. Clin.*, 23(2): 94-102.

**Martinez, J.J.; Seveau, S.; Veiga, E.; Matsuyama, S.; Cossart, P. 2005.** Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*. 123(6): 1013-1023.

**Martins, T.F.; Lado, P.; Labruna, M.B. y Venzal, J.M. 2014.** El género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en Uruguay: especies, distribución, hospedadores, importancia sanitaria y claves para la determinación de adultos y ninfas. *Veterinaria* (Montevideo). En prensa.

**McKiel, J.A.; Bell, E.J.; Lackman, D.B. 1967.** *Rickettsia Canada*: A new member of the Typhus Group of rickettsiae isolated from *Haemaphysalis leporispalustris* ticks in Canada. *Can. J. Microbiol.*, 13(5): 503-510.

**McLeod, M.P.; Qin, X.; Karpathy, S.E.; Gioia, J.; Highlander, S.K.; Fox, G.E.; McNeill, T.Z.; Jiang, H.; Muzny, D.; Jacob, L.S.; Hawes, A.C.; Sodergren, E.; Gill, R.; Hume, J.; Morgan, M.; Fan, G.; Amin, A.G.; Gibbs, R.A.; Hong, C.; Yu, X.J.; Walker, D.H.; Weinstock, G.M. 2004.** Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae. *J. Bacteriol.*, 186(17): 5842-5855.

**Medina-Sanchez, A. Bouyer, D.H.; Alcantara-Rodriguez, V.; Mafra C.; Zavala-Castro, J.; Whitworth, T.; Popov, V.L.; Fernandez-Salas, I.; Walker, D.H. 2005.** Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063: 327–332.

**Moraes-Filho, J.; Pinter, A.; Pacheco, R.C.; Gutmann, T.B.; Barbosa, S.O.; Gonzáles, M.A.; Muraro, M.A.; Cecílio, S.R.; Labruna, M.B. 2009.** New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of Sao Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9(1): 73-8.

**Moraes-Filho, J.; Marcili, A.; Nieri-Bastos, F.A.; Richtzenhain, L.J.; Labruna, M.B. 2011.** Genetic analysis of ticks belonging to

the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.*, 6: 51–55.

**Moran, N.A. y Mira, A. 2001.** The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biology*. 2(12): RESEARCH 0054.

**Murrell, A.; Campbell, N.J.; Barker, S.C. 2000.** Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 16: 1-7.

**Murrell, A.; Campbell, N.J.; Barker, S.C. 2001.** A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 21: 244-58.

**Nava, S.; Elshenawy, Y.; Eremeeva, M.E.; Sumner, J.W.; Mastropaolo, M.; Paddock, C.D. 2008a.** *Rickettsia parkeri* in Argentina. *Emerg. Inf. Dis.*, 14: 1894–1897.

**Nava, S. Pérez-Martínez, L.; Venzal, J.M.; Portillo, A.; Santibáñez, S.; Oteo, J.A. 2008b.** *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* from Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8: 465–466.

**Nava, S; Mangold, AJ; Mastropaolo, M; Venzal, JM; Fracassi, N; Guglielmo, AA. 2011.** Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Vet. parasitol.*, 181: 301-308.

**Neer, T.M. y Harrus, S. 2006.** Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* (3rd ed) (Greene, C.E., ed.), pp. 203–216, Saunders Elsevier.

**Ngonyo Maina, A. 2012.** Sero-epidemiology and molecular characterization of Rickettsiae infecting humans, selected animals and arthropod vectors in Asembo, western Kenya, 2007-2010. Tesis doctoral.

**Nicholson, W.; Allen, K.; McQuiston, E. 2010.** The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people.” *Trends Parasitol.*, 26(4); 205-213.

**Nieri-Bastos, F.A.; Szabó, M.J.P.; Pacheco, R.C.; Soares, J.F.; Soares, H.S., Moraes-Filho, J.; Dias, R.A. y Labruna, M.B. 2013.** Comparative Evaluation of Infected and Noninfected *Amblyomma triste* Ticks with *Rickettsia parkeri*, the Agent of an Emerging Rickettsiosis in the New World. *BioMed Research International*. 2013: 1-6.

**Ogata, H.; Audic, S.; Renesto-Audiffren, P.; Fournier, P.E.; Barbe, V.; Samson, D.; Roux, V.; Cossart, P.; Weissenbach, J.; Claverie, J.M. y Raoult D. 2001.** Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science*. 293(5537): 2093-2098.

**Onofrio, V.C.; Venzal, J.M.; Pinter, A.; Szabó, M.P.J. 2006.** Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. Capítulo 4, pp. 29-39. En: Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M. y Bechara, G.H. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan. 223 pp.

**Pacheco, R.C.; Venzal, J.M.; Richtzenhain, L.J.; Labruna, M.B. 2006.** *Rickettsia parkeri* in Uruguay. *Emerg. Inf. Dis.*, 12: 1804-1805.

**Pacheco, R.C.; Moraes-Filho, J.; Nava, S.; Brandao, P.E.; Richtzenhain, L.J.; Labruna, M.B. 2007.** Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Exp. Appl. Acarol.*, 43: 63-71.

**Pacheco, R.C.; Moraes-Filho, J.; Guedes, E.; Silveira, I.; Richtzenhain, L.J.; Leite, R.C.; Labruna, M.B. 2011.** Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med. Vet. Entomol.*, 25: 148-155.

**Pacheco, R.C.; Echaide, I.E.; Alves, R.N.; Beletti, M.E.; Nava, S.; Labruna, M.B. 2013.** *Coxiella burnetii* in Ticks, Argentina. *Emerg. Inf. Dis.*, 19(2): 344-346.

**Paddock, C.D. 2005.** “*Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere”. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1063: 315– 326.

**Paddock, C.D. 2009.** The science and fiction of emerging rickettsioses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1166: 133-143.

**Paddock, C.D.; Greer, P.W.; Ferebee, T.L.; Singleton, Jr.J.; McKechnie, D.B.; Treadwell, T.A.; Krebs, J.W.; Holman, R.C.; Olson, J.G.; Childs, J.E.; Zaki, S.R. 1999.** Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. *J. Infect. Dis.*, 179: 1469-1476.

**Paddock, C.D.; Holman, R.C.; Krebs, J.W.; Childs, J.E. 2002.** Assessing the magnitude of fatal Rocky Mountain Spotted Fever in the United States: comparison of two National data sources. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67(4): 349-354.

**Paddock, C.D.; Sumner, J.W.; Comer, J.A.; Zaki, S.R.; Goldsmith, C.S.; Goddard, J.; McLellan, S.L.; Tamminga, C.L.; Ohl, C.A. 2004.** *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 38: 805-811.

**Paddock, C.D. y Yabsley, M.J. 2007.** Ecological Havoc, the Rise of White-Tailed Deer, and the Emergence of *Amblyomma americanum* -Associated Zoonoses in the United States. *CTMI* (2007) 315: 289–324.

**Paddock, C.D.; Fernández, S.; Echenique, G.A.; Summer, J.W.; Reeves, W.K.; Zaki, S.R.; Remondégui, C.E. 2008.** Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78: 687-692.

**Parker, R.R. 1940.** A pathogenic rickettsia from the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*, p. 390-391. *In* Report of the Proceedings of the Third International Congress for Microbiology, New York, September 2-9, 1939. International Association of Microbiologists, New York, NY.

**Parker, R.R.; Kohls, G.M.; Cox, G.W. y Davis, G.E. 1939.** Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. *Public Health Rep.*, 54: 1482-1484.

**Parola, P.; Paddock, C.D.; y Raoult, D. 2005.** Tick-Borne Rickettsioses Around The World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(4): 719–756.

**Parola, P.; Socolovschi, C.; Jeanjean, L.; Bitam, I.; Fournier, P-E.; Sotto, A., Labauge, P.; Raoult, D. 2008.** Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2(11): e338.

**Pena, D.C.; Mafra, C.L.; Calic, S.B.; Labruna, M.B.; Milagres, B.S.; Walker, D.H.; Galvao, M.A. 2009.** Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15(2): 243-244.

**Philip, R.N.; Casper, E.A.; Burgdorfer, W.; Gerloff, R.K.; Hugues, L.E.; Bell, E.J. 1978.** Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *J. Immunol.*, 121: 1961-1968.

**Pinter, A.; y Labruna, M.B. 2006.** Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1078: 523-529.

**Pinter, A.; Horta, M.C.; Pacheco, R.C.; Moraes-Filho, J. y Labruna, M.B. 2008.** Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 24(2): 247-252.

**Piranda, E.M.; Faccini, J.L.; Pinter, A.; Saito, T.B.; Pacheco, R.C.; Hagiwara, M.K.; Labruna, M.B. 2008.** Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103: 696–701.

**Poinar, G. y Brown, A.E. 2003.** A new genus of hard ticks in Cretaceous Burmese amber (Acari: Ixodida: Ixodidae). *Syst. Parasitol.*, 54: 199–205.

**Poinar, G. Jr. y Buckley, R. 2008.** *Compluriscutula vetulum* (Acari: Ixodida: Ixodidae), a new genus and species of hard tick from Lower Cretaceous Burmese amber. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 110 (2): 445-450.

**Portillo, A.; García-García, C.; Sanz, M.M.; Santibáñez, S.; Venzal, J.M.; Oteo, J.A.** A confirmed case of *Rickettsia parkeri* infection in a traveler from Uruguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, En prensa.

**Radulovic, S.; Troyer, J.M.; Beier, M.S.; Lau, A.O. y Azad, A.F. 1999.** Identification and molecular analysis of the gene encoding *Rickettsia typhi* hemolysin: Infect. Immun., 67(11): 6104-6108.

**Raoult, D. y Roux, V. 1997.** Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev., 10: 694-719.

**Raoult, D.; Aboudharam, G.; Crubezy, E.; Larrouy, G.; Ludes, B. y Drancourt, M. 2000.** Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 12800–12803.

**Regnery, R.L.; Fu, Z.Y.; y Spruill, C.L. 1985.** Flying squirrel-Associated *Rickettsia prowazekii* (Epidemic Typhus Rickettsiae) Characterized by specific DNA fragment produced by restriction Endonuclease Digestion. J. Clin. Microbiol., 23(1): 89-191

**Regnery, R.L.; Spruill, C.L.; Plikaytis, B.D. 1991.** Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol., 173: 1576-1589.

**Renesto, P.; Dehoux, P.; Gouin, E.; Touqui, L.; Cossart, P. y Raoult, D. 2003.** Identification and characterization of a phospholipase D-superfamily gene in rickettsiae: J. Infect. Dis., 188(9): 1276-1283.

**Ribeiro, J.M. 1989.** Role of saliva in tick/host interactions. Exp. Appl. Acarol., 7:15-20.

**Rodríguez González, M. y Lujambio L. 1954.** Los Ixódidos del perro en el Uruguay. An. Fac. Vet. Montevideo. 6: 107-111.

**Romer, Y.; Seijo, A.C.; Crudo, F.; Nicholson, W.L; Varela-Stokes, A.; Lash, R.R.; Paddock, C.D. 2011.** *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. Emerg. Inf. Dis., 17: 1169-1173.

**Roux, V.; Fournier, P.E. y Raoult, D. 1996.** Differentiation of Spotted Fever Group Rickettsiae by Sequencing and Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR Amplified DNA of the Gene Encoding the Protein rOmpA. J. Clin. Microbiol., 34(9): 2058-65.



**Rutherford, S.J.; Macaluso, K.R.; Smith, N.; Zaki, S.R.; Paddock, S.D.; Davis, J.; Peterson, N.; Azad, A.F.; y Rosenberg, R. 2004.** Fatal Spotted Fever Rickettsiosis, Kenya. *Emerg. Inf. Dis.*, 10(5): 910-913.

**Saito, T.B.; Cunha-Filho, N.A.; Pacheco, R.C.; Ferreira, F.; Pappen, F.G.; Farias, N.A.; Larsson, C.E.; Labruna, M.B. 2008.** Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79: 102-108.

**Sampaio, I. y Larrosa, A. 1992.** Hallazgo de *Amblyomma tigrinum* (Koch 1844) (Acari, Ixodidae) en el Uruguay. *Bol. Soc. Zool. Uruguay* (2ª época). 7: 87.

**Sarasúa, L.M. y Donati, N.R. 1976.** Constatación de babesiosis canina en el Dpto. de Artigas (Uruguay). *Veterinaria* (Montevideo). 62: 137-139.

**Seijo, A.; Picollo, M.; Nicholson, W.; Paddock, C.D.; 2007.** Fiebre manchada por rickettsias en el Delta del Paraná. Una enfermedad emergente. *Medicina* (Buenos Aires). 67: 723–726.

**Shaw, S.E., Day, M.J.; Birtles, R.J.; Breitschwerdt, E.B. 2001.** Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.*, 17: 74–80.

**Silva, L.J. y Papaiordanou, P.M.O. 2004.** Tifo murino (endémico) no Brasil: relato de caso e revisao. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 46: 283–285.

**Silva, N.; Eremeeva, M.E.; Rozental, T.; Ribeiro, G.S.; Paddock, C.D.; Ramos, E.A.G.; Favacho, A.R.M.; Reis, M.G.; Dasch, G.A.; de Lemos, E.R.S.; Ko, A.I. 2011.** Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg. Inf. Dis.*, 17(2): 275-278.

**Silveira, I.; Pacheco, R.C.; Szabó, M.P.J.; Ramos, H.G.C.; Labruna, M.B. 2007.** *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg. Inf. Dis.*, 13: 1111-1113.

**Soares, J.F.; Giroto, A.; Brandão, P.E.; Da Silva, A.S.; Franc, R.; Lopes, S.T.A.; Labruna, M.B. 2011.** Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 180:203-208.

**Szabó, M.P.; Mangold, A.J.; João, C.F.; Bechara, G.H.; Guglielmone, A.A. 2005.** Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of



the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet. Parasitol.*, 6: 131–140.

**Szabó, M.P.J.; Pinter, A.; Labruna, M.B. 2013.** Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 3 (27): 1-9.

**Thorner, A.R.; Walker, D.H. y Petri W.A. Jr. 1998.** Rocky Mountain Spotted Fever. *Clin. Inf. Dis.*, 27: 1353–1360.

**Tomassone, L.; Nuñez, P.; Ceballos, L.A.; Gurtler, R.E.; Kitron, U.; Farber, M. 2010a.** Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. strain Argentina” and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Exp. Appl. Acarol.*, 52: 93-100.

**Tomassone, L.; Conte, V.; Parrilla, G.; De Meneghi, D. 2010b.** *Rickettsia* infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10: 953-958.

**Travassos, J.; Rodrigues, P.M. y Carrijo, L.N. 1949.** Tifo murino em Sao Paulo. Identificacao da *Rickettsia mooseri* isolada de um caso humano. *Mem. Inst. Butantan.* 21: 77–106.

**Uilenberg, G. 2006.** *Babesia*- A historical review. *Vet. Parasitol.*, 138: 3-10.

**Venzal, J.M. 2008.** Estudios sobre garrapatas y enfermedades transmitidas en Uruguay. Tesis doctoral, 276 pp.

**Venzal, J.M. 2013.** Epidemiología de rickettsiosis por *Rickettsia parkeri* y otras especies emergentes o re-emergentes asociadas a la antropización en Latinoamérica. *Acta Méd. Costarric.*, 55(1): 45-47.

**Venzal, J.; Castro, O.; Cabrera, P.; Armúa, M. 2001.** Garrapatas de perros del Uruguay. Especies y distribución. VII Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

**Venzal, J.M.; Castro, O.; Cabrera, P.A.; de Souza, C.G.; Guglielmone, A.A. 2003a.** Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. *Veterinaria (Montevideo)*. 38(150-151): 17-28.

**Venzal, J.M.; Castro, O.; Cabrera, P.A.; de Souza, C.G.; Guglielmone, A.A. 2003b.** Garrapatas de importancia médica y veterinaria en Uruguay. *Entomol. Vect.*, 10: 635-650.

**Venzal, J.M.; González, E.M.; Capellino, D.; Estrada-Peña, A.; Guglielmone, A.A. 2003c.** First record of *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) and new records of *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969 (Acari: Argasidae) on Neotropical bats. *Syst. Appl. Acarol.*, 8: 93-96.

**Venzal, J.M.; Guglielmone, A.A.; Estrada-Peña, A.; Cabrera, P.A.; Castro, O. 2003d.** Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 97: 769-772.

**Venzal, J.M.; Portillo, A.; Estrada-Peña, A.; Castro, O.; Cabrera, P.A.; Oteo, J.A. 2004.** *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerg. Inf. Dis.*, 10: 1493-1495.

**Venzal, J.M.; Félix, M.L.; Olmos, A.; Mangold, A.J.; Guglielmone, A.A. 2005.** A collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. *Exp. Appl. Acarol.*, 36: 325-331.

**Venzal, J.M.; Pérez-Martínez, L.; Félix, M.L.; Portillo, A.; Blanco, J.R.; Oteo J.A. 2006.** Prevalence of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from Uruguay. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1078: 305-308.

**Venzal, J.M.; Estrada-Peña, A.; Castro, O.; de Souza, C.G.; Portillo, A.; Oteo, J.A. 2007.** Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. *Parasitol. Latinoamer.*, 62: 23-26.

**Venzal, J.M.; Estrada-Peña, A.; Castro, O.; de Souza, C.G.; Félix, M.L.; Nava, S.; Guglielmone, A.A. 2008a.** *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): Hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 155: 104-109.

**Venzal, J.M.; Nava, S.; Beldoménico, P.M.; Barros-Battesti, D.M.; Estrada-Peña, A.; Guglielmone, A.A. 2008b.** Hosts and distribution of

*Ixodes longiscutatus* Boero, 1944 (Acari: Ixodidae). Syst. App. Acarol., 13: 102–108.

**Venzal, J.M.; Estrada-Peña, A.; Portillo, A.; Mangold, A.J.; Castro, O.; De Zonza, C.G.; Félix, M.L.; Pérez-Martínez, L.; Santibáñez, S.; Oteo, J.A. 2008c.** Detection of Alpha and Gamma-Proteobacteria in *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) from Uruguay. Exp. App. Acarol., 44: 49-56.

**Venzal, J.M.; Estrada-Peña, A.; Portillo, A.; Mangold, A.J.; Castro, O.; de Souza, C.G.; Félix, M.L.; Pérez-Martínez, L.; Santibáñez, S.; Oteo, J.A. 2012.** *Rickettsia parkeri*: a rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 54(3): 131-134.

**Vitale, G.; Mansueto, S.; Rolain, J.M.; Raoult, D. 2006.** *Rickettsia massiliae* Human isolation. Emerg. Infect. Dis., 12(1): 174–175.

**Vitrino, L.; Chelo, I.M.; Bacellar, F. y Zeze, L. 2007.** *Rickettsia* phylogeny: a multigenic approach. Microbiology. 153: 160-168.

**Walker D.H. 1995.** Rocky mountain Spotted Fever: A seasonal Alert. Clin. Inf. Dis., 20: 1111-1117.

**Walker, J.B.; Keirans, J.E.; Horak, I.G. 2000.** The genus *Rhipicephalus* (Acari:Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. Cambridge Univ. Press, London. 643 pp.

**Weinert, L.A.; Werren, J.H.; Aebi, A.; Stone, G.N.; Jiggins, F.M. 2009.** Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biol., 7: 6.

**Whitman, T.J. Richards, A.L.; Paddock, C.D.; Tamminga, C.L.; Sniezek, P.J.; Jiang, J.; Byers, D.K.; Sanders, J.W. 2007.** *Rickettsia parkeri* infection after tick bite, Virginia. Emerg. Infect. Dis., 13: 334–336.

**Wikel, S.K. 1996.** Host immunity to ticks. Annu. Rev. Entomol., 41: 1-22.

**Wikel, S.K. 1999.** Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. Int. J. Parasitol., 29: 851-9.

**Woese, C.R. 1987.** Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51: 222–270.

**Yu, X.J. y Walker, D.H. 2003.** The Order Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed). The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community. (3.ed.) New York: Springer-Verlag.

**Yu, X. y Walker, D. H. 2012.** Rickettsia and Rickettsial Diseases, Chapter 9. In: BIOTERRORISM, Edited by Stephen A. Morse, 202 pp.

**Zavala-Castro, J.E.; Zavala-Velázquez, J.E.; Walker, D.H.; Ruiz Arcila, E.E.; Laviada-Molina, H.; Olano, J.P.; Ruiz-Sosa, J.A.; Small, M.A.; Dzul-Rosado, K.R. 2006.** Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, México. Emerg. Infect. Dis., 12: 672–674.

**Zavala-Castro, J.E.; Zavala-Velázquez, J.E.; del Rosario García, M.; León, J.J.; Dzul-Rosado, K.R. 2009.** A dog naturally infected with *Rickettsia akari* in Yucatan, México. Vector Borne Zoonotic Dis., 9(3): 345-347.

**Zavala-Velazquez, J.E.; Yu, X.J.; Walter, D.H. 1996.** Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg., 55: 157-159.

**Zientz, E.; Silvia, F.J. y Gross R. 2001.** Genome Interdependence in Insect-Bacterium Symbioses. Genome Biology. 2(12): 1032-1032.6.