



Hospital San Pedro-CIBIR.
Logroño, España.

Departamento de Enfermedades
Infecciosas. Centro de Rickettsiosis
y Enfermedades Transmitidas por
Artrópodos Vectores (JAO).

Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria. Rafaela,
Argentina (SN).

Centro de Estudos de Vetores
e Doenças Infecciosas. Aguas de
Moura, Portugal (RS).

Universidad de Córdoba.
Colombia.

Instituto de Investigaciones
Biológicas del Trópico (SM).

Universidad de la República.
Salto, Uruguay.

Laboratorio de Vectores y
Enfermedades Transmitidas,
Regional Norte (JM.V).

Pontificia Universidad Católica,
Santiago, Chile.

Facultad de Medicina. División de
Pediatria (KA).

Universidad de Sao Paulo,
Brasil.

Departamento de Medicina
Veterinaria Preventiva e Saúde
Animal (ML).

Centro de Investigación
Regional Dr. Hideyo Noguchi.
Mérida, México (JZ-C).

*Por la RIICER (Red Iberoamericana
para la Investigación y Control de
las Enfermedades Rickettsiales)
del Programa Iberoamericano
de Ciencia y Tecnología para el
Desarrollo (CYTED)

**Miembros de la RIICER en orden
alfabético:

Katia Abarca (Pontificia Universidad
Católica de Chile; Chile), Sergio
Bermúdez (Instituto Gorgas;
Panamá), Gaby Dolz (Universidad
Nacional; Costa Rica), Marcelo B.
Labruna (Universidad de Sao Paulo;
Brasil), Salim Mattar (Universidad de
Córdoba; Colombia), Santiago Nava
(Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria; Argentina), José A.
Oteo (Hospital San Pedro-CIBIR;
España), Luis Romero (Ministerio
de Agricultura y Ganadería; El
Salvador), Rita de Sousa (Instituto
Nacional de Saúde Dr. Ricardo
Jorge; Portugal), José M. Venzal
(Universidad de la República;
Uruguay), Jorge Zavala-Castro
(Centro de Investigación Regional
Dr. Hideyo Noguchi; México).

Conflictos de interés: Los autores
declaran no tener ningún conflicto
de interés.

Financiamiento: RIICER (Red
Iberoamericana para la
Investigación y Control de las
Enfermedades Rickettsiales)
del Programa Iberoamericano
de Ciencia y Tecnología para el
Desarrollo (CYTED).

Recibido: 17 de diciembre de 2013

Correspondencia a:
José A. Oteo
jaoteo@riojasalud.es

Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas

José A. Oteo, Santiago Nava, Rita de Sousa, Salim Mattar, José M. Venzal, Katia Abarca, Marcelo B. Labruna y Jorge Zavala-Castro, por la RIICER

Latinamerican guidelines of RIICER for diagnosis of tick-borne rickettsioses

Tick-borne rickettsioses are worldwide infectious diseases that are considered emerging and re-emerging. Until recently the only tick-borne rickettsiosis present in Latin America was *Rickettsia rickettsii* infection, but to date, with the incorporation of new tools as PCR and sequencing and the quick cellular close tube cultures (*Shell-vial*), new species has been involved as human pathogens. In these guidelines, we offer an update of the microbiological assays for diagnosing rickettsioses. Besides we have included a section in which the most important hard ticks involved in human rickettsioses in Latin America are detailed.

Key words: Rickettsioses; guidelines; Latin America; ticks; indirect immunofluorescence; PCR; cellular culture.

Palabras clave: Rickettsiosis; guías; Latinoamérica; garrapatas; inmunofluorescencia indirecta; RPC; cultivo celular.

Introducción

Las rickettsiosis o enfermedades provocadas por *Rickettsia* spp., son afecciones de distribución mundial transmitidas por artrópodos vectores que por diferentes motivos tienen un carácter emergente y re-emergente¹⁻⁴. Algunos autores han querido ver en las rickettsiosis, y específicamente en el tifus exantemático o epidémico transmitido por piojos, el origen de las grandes plagas que asolaron Europa y el Nuevo Mundo. La Paleomicrobiología ha dado respuesta a muchas de estas cuestiones históricas, y aunque dudosamente fue causa de estas plagas, sabemos a ciencia cierta que *Rickettsia prowazeki* ha sido causante de millones de muertes hasta el siglo pasado. Si fue introducida en el siglo XV por los españoles en el “Nuevo Mundo” o existía ya en América es un tema de debate. Hubo que esperar hasta 1909 para que Charles Nicolle diera a conocer que el piojo era el vector de esta terrible infección, y que con simples medidas higiénicas, como cambiarse de ropa y lavarla con cierta frecuencia, se rompía la cadena de transmisión. Casi paralelamente, en los Estados Unidos de América (E.U.A.), Howard T. Ricketts describió entre 1906 y 1909 las características del agente causal de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, *Rickettsia rickettsii*, en este caso, transmitida por garrapatas. A partir de aquí, comenzó una carrera por la descripción de estos agentes y los diferentes vectores implicados en su transmisión. No obstante, ha sido en los últimos 20 años cuando se ha dado un gran empuje al conocimiento de estas infecciones.

Este empuje se ha propiciado gracias a la incorporación de las técnicas de biología molecular y a la extensión del uso de los medios de cultivo celular en tubo cerrado o *shell-vial* que han permitido describir nuevas especies de *Rickettsia* e implicarlas en diferentes cuadros clínicos⁵.

A pesar de que el riesgo de una posible epidemia de tifus exantemático relacionada con focos de pobreza, hacinamiento, o falta de higiene en el contexto de una guerra o desastre natural, no se puede descartar, en la actualidad son las rickettsiosis transmitidas por garrapatas las que por su carácter endémico y emergente nos preocupan. A este respecto, hasta hace escasos años, la única rickettsiosis transmitida por garrapatas en el continente americano era la provocada por *R. rickettsii* (fiebre manchada de las Montañas Rocosas, fiebre de Tobía, fiebre maculosa brasilera, etc.) ya que *Rickettsia africae* quedaba confinada a algunas islas del Caribe³. La reciente implicación de *Rickettsia parkeri* como agente causal de fiebres manchadas en América^{6,7} y la descripción de otras especies de *Rickettsia* con poder patógeno ha cambiado nuestra percepción del riesgo y extensión de estas afecciones^{8,9}.

El continente americano, sobre todo Centroamérica y algunos países de Sudamérica, está sufriendo una gran epidemia de dengue. Considerando que la clínica de ambas afecciones puede ser similar (fiebre con o sin exantema y signos pseudo-gripales), y que en algunos casos la confusión o un retraso en el diagnóstico puede resultar fatal, es altamente necesario que los clínicos posean herramientas para distinguir una rickettsiosis de ésta u otras entidades.



El género *Rickettsia* incluye las bacterias del phylum Proteobacteria, subclase α -1 del orden Rickettsiales. Viven en el citoplasma y con menos frecuencia en el núcleo de las células que infectan y se caracterizan por ser pequeños cocobacilos (0,3 a 1 μ m) de crecimiento obligado intracelular. Tienen un genoma que oscila entre 1,1 y 1,6 Mb. A pesar de ser clasificadas como gramnegativas, se tiñen mal mediante esta tinción, pudiéndose poner de manifiesto mediante la tinción de Giménez, Giemsa y naranja de acridina^{10,11}. En su pared poseen lipopolisacárido (LPS) y peptidoglicano. No crecen en los medios de cultivo habituales, precisando animales de laboratorio, huevos embrionados o líneas celulares como Vero, HEL, L-929 o líneas celulares de artrópodos. Presentan además diferentes proteínas mayores de superficie, entre las que destacan la OmpA (190 kDa) que está presente fundamentalmente en las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (rickettsiosis transmitidas por garrapatas y *Rickettsia felis*) y la OmpB (135 kDa), presente en todas las especies de *Rickettsia*. Estas proteínas de superficie son importantes dianas para la inmunidad humoral y también se utilizan para la serotipificación. El LPS de las rickettsias contiene zonas altamente antigénicas que son responsables de las reacciones cruzadas observadas entre las diferentes especies de *Rickettsia*.

Las especies de *Rickettsia* pasan, al menos parte de su ciclo vital, en un artrópodo que puede actuar a su vez como reservorio y/o como vector¹¹, y han sido clasificadas en dos grupos: grupo tifus (GT) que incluye *Rickettsia typhi* y *R. prowazekii* cuyos vectores son pulgas y piojos respectivamente; y el grupo de las fiebres manchadas (GFM) que incluye más de 20 especies y tienen como principales vectores a las garrapatas duras (Ixodidae)¹⁰. No obstante, estudios basados en las secuencias genómicas han definido otros dos grupos (ancestral y transicional)¹².

Muchas rickettsias del GT y GFM causan enfermedades en humanos y posiblemente en animales en diferentes partes del mundo. El tifus exantemático o epidémico, transmitido por el piojo corporal (*Pediculus humanus corporis*) y el tifus murino o endémico, transmitido por la pulga de la rata (*Xenopsylla cheopis*) y por la pulga del gato (*Ctenocephalides felis*), están o han estado presentes en todo el mundo¹³. En contraste, las rickettsias del GFM, si bien se han descrito también en todo el mundo, tienen su distribución íntimamente relacionada con la distribución de las diferentes especies de garrapatas. Una excepción del GFM es la fiebre manchada transmitida por pulgas, provocada por *R. felis*, que tiene una distribución prácticamente universal al igual que su vector (*C. felis*)¹⁴. Existen otras rickettsiosis que son transmitidas por ácaros como es el caso de *Rickettsia akari*, vehiculada por el ácaro del ratón común (*Allodermomyssus sanguineus*) y distribuida por todo el mundo, o el caso de *Orientia tsutsugamushi* (antes *Rickettsia tsutsugamushi*) vehiculada por diferentes

especies de trombicúlidos y causante de la fiebre de los matorrales en diferentes zonas de Oriente^{14,10}. Esta última ha sido recientemente diagnosticada por primera vez en América, específicamente en Chile¹⁵.

Gracias a las técnicas de biología molecular y al desarrollo del cultivo de estos agentes en tubo cerrado (*shell-vial*), en las últimas décadas se ha producido un incremento en la descripción de nuevas especies y de *Candidatus* a nuevas especies. Algunas de ellas, previamente consideradas no patógenas, han demostrado su patogenicidad en humanos. Es el caso en Europa de *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia massiliae* y *Rickettsia monacensis* o '*Candidatus Rickettsia rioja*'². En América, el ejemplo es *R. parkeri*, un viejo miembro del GFM, descrito por primera vez en 1939, que 65 años más tarde ha resultado ser patógena⁷. Estos hechos demuestran que cualquier especie nueva de *Rickettsia* descrita en garrapatas, debe ser considerada potencialmente patógena para los humanos. Así, en los próximos años habrá que poner atención a lo que suceda con las especies y candidatas a especies que están siendo descritas en Latinoamérica como *Rickettsia* sp. cepa colombianense, variantes de *R. parkeri* o '*Candidatus Rickettsia andeanae*'^{8,16,17}.

El diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas sigue basándose fundamentalmente en la sospecha clínica (fiebre con o sin exantema y/o con o sin escara en el punto de picadura de la garrapata) y en la detección de anticuerpos mediante técnicas de serología como la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Otras técnicas ya señaladas como el cultivo y sobre todo las técnicas de biología molecular, como la reacción de polimerasa en cadena (RPC) y posterior secuenciación, se van incorporando a la rutina de los laboratorios de microbiología clínica.

Recientemente, por mediación del CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), se creó la Red Iberoamericana para la Investigación y Control de las Enfermedades Rickettsiales (RIICER). Una de sus primeras actividades fue la realización de un catálogo de las rickettsiosis presentes en Iberoamérica³. Cumpliendo con los objetivos de la red, los miembros de la RIICER ofrecemos estas guías consensuadas para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas en Latinoamérica. Tras esta introducción se detallan y describen las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico microbiológico de las rickettsiosis. Además, nos ha parecido interesante incluir una sección en la que se detallan las diferentes especies de garrapatas relacionadas con las rickettsiosis en Latinoamérica, con claves para su clasificación taxonómica.

Estamos convencidos de que un correcto diagnóstico puede salvar muchas vidas, y que es fundamental distinguir los diferentes cuadros clínicos causantes de fiebre y exantema. Al igual que otras sociedades científicas



de E.U.A. y Europa que han elaborado sus guías¹⁸⁻²⁰, esperamos que éstas sean de utilidad para la comunidad científico-médica en Latinoamérica.

Diagnóstico microbiológico

Recolección, conservación y transporte de las muestras humanas y garrapatas

La selección de las muestras dependerá en cierta medida de los signos y síntomas con los que se presente el paciente, del tiempo de evolución de la enfermedad, así como de la infraestructura y capacidades de diagnóstico disponibles en el laboratorio de microbiología donde se vayan a procesar. Los especímenes más adecuados para el diagnóstico de rickettsiosis son: sangre con anticoagulante (heparina, EDTA y citrato); suero; biopsia cutánea de las pápulas, vesículas o escara de inoculación; hisopado de la escara; y la propia garrapata (Tabla 1)¹⁹⁻²¹. La selección de la muestra dependerá del tipo de diagnóstico solicitado por el médico clínico (serología, técnicas moleculares o cultivo). En lo posible, siempre se debe recoger la mayor cantidad de la muestra o muestras a estudiar y guardar parte de las mismas para posteriores evaluaciones o empleo futuro de otras técnicas. En función de la muestra objeto de estudio, ésta se recogerá de forma estéril y, de ser posible, antes del inicio del tratamiento antibacteriano.

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir una serie de condiciones que determinarán, en cierto grado, la eficiencia y la calidad de los resultados obtenidos (Tabla 1). Además, para optimizar la rentabilidad microbiológica resulta de vital importancia transportar la muestra en unas determinadas condiciones de tem-

peratura en el menor tiempo posible. Por ejemplo, en el caso de que se vaya a realizar cultivo, el procesamiento de la muestra no se debe demorar. En el caso de que no se pueda procesar de forma inmediata o en las próximas horas, y/o se vaya a enviar a un centro de referencia, se debe congelar a -80°C lo antes posible. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles con cierre hermético, mediante mensajería urgente en hielo seco para evitar la descongelación. Se debe tener siempre presente la legislación vigente en cada país sobre transporte de materiales biológicos y peligrosos²².

Aunque hay pocos estudios sobre la disminución de la viabilidad de las rickettsias a temperatura ambiente o por la acción de la congelación-descongelación de la muestra, es conocida la dificultad de aislar estos agentes a partir de muestras en las que se demora el cultivo celular. Factores como la temperatura elevada (> 37°C), el sobre-crecimiento de otras bacterias y la refrigeración prolongada, pueden comprometer el aislamiento de las rickettsias²³. Menos requerimientos se precisan para el diagnóstico molecular, puesto que los ácidos nucleicos permanecen estables aun cuando la bacteria no es viable. Por tanto, en estos casos las muestras se enviarán refrigeradas. En el caso de que el procesamiento se vaya a demorar más de 24 h, las muestras se deben congelar a -20°C. El recipiente de recogida se identificará con los datos del paciente (nombre y localización), y debe estar protegido para que no se rompa en el transporte.

Los utensilios y envases con los que se recogerán y transportarán las muestras dependen del tipo de la misma (Tabla 1). Básicamente pueden ser: tubos estériles con tapón para sangre, frascos estériles para fragmentos de tejidos y garrapatas, o hisopos de algodón estériles para

Tabla 1. Recomendaciones para el diagnóstico de rickettsiosis, incluyendo tipo de muestra, conservación y transporte

Muestra	Medio de recolección	Tiempo y temperatura de transporte	Conservación	Prueba diagnóstica
Suero	Tubo de suero	< 24 h, 2-8°C	> 24 h, -20°C	IFI/RPC
Sangre con heparina o citrato	Tubo con heparina o citrato	> 24 h, hielo seco	Procesar de inmediato o congelar a -80°C	Cultivo
Sangre con EDTA o citrato	Tubo con EDTA o citrato	< 24 h, 2-8°C > 24 h, -20°C	> 24 h, -20°C	RPC
LCR	Tubo estéril	< 24 h, 2-8°C > 24 h, -20°C	> 24 h, -20°C	IFI/RPC/Cultivo
Biopsia cutánea	Frasco estéril	> 24 h, -20°C > 24 h, hielo seco	> 24 h, -20°C Procesar de inmediato o congelar a -80°C	RPC Cultivo
Contenido pápulas/ máculas/escara	Tubo estéril/hisopo	< 24 h, 2-8°C > 24 h, -20°C	> 24 h, -20°C	RPC
Garrapata	Tubo/Frasco	< 24 h, 2-8°C > 24 h, -20°C > 1 semana, etanol 70%/absoluto > 24 h, hielo seco	> 24 h, -20°C > 24 h, -20°C > 1 semana, etanol 70%/absoluto Procesar de inmediato o congelar a -80°C	RPC Cultivo

IFI: inmunofluorescencia indirecta. RPC: reacción de polimerasa en cadena. EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (anti-coagulante).



la toma de muestras de superficies corporales (secreciones de pápulas y máculas, o las tomadas directamente sobre la escara de inoculación).

Al llegar al laboratorio se debe tener en cuenta que todas las muestras clínicas deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Antes de procesarse deben someterse a una inspección ocular para asegurarse que han sido bien seleccionadas, recolectadas y transportadas. En función del examen solicitado la muestra se procesará en un laboratorio con un nivel de bioseguridad 2 ó 3.

Diagnóstico serológico de las rickettsiosis mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La IFI es la técnica más utilizada para el diagnóstico de las rickettsiosis. Se basa en la detección de anticuerpos (Ac) en el suero del paciente, puestos de manifiesto mediante una anti-globulina humana marcada con fluoresceína y que, en caso de una reacción positiva, permite la visualización de las rickettsias mediante el microscopio de fluorescencia (Figura 1). La muestra a estudiar es el suero, el cual se puede mantener a temperatura ambiente por corto tiempo o refrigerado durante varios días. En el caso de que no se vaya a procesar en las siguientes 48 horas, se debe congelar (mínimo a -20°C). Debido a que la producción de Ac en un paciente afecto de rickettsiosis puede tardar varias semanas, se debe obtener suero en el momento agudo de la enfermedad y en la fase de convalecencia (al menos tras dos semanas)^{19,20}. La IFI es usada para detectar las inmunoglobulinas IgM e IgG, tanto en fase aguda como en la convalecencia. En general, están establecidos como punto de corte títulos de $\text{IgG} \geq 1:64$ e $\text{IgM} \geq 1:32$ ¹⁹. Dado que la prevalencia de Ac en la población sana puede ser elevada, un simple título de Ac no debe considerarse, por sí solo, diagnóstico de infección activa. La confirmación del diagnóstico de rickettsiosis requiere una seroconversión (es decir pasar de la no detección de Ac a ser detectados) o un sero-refuerzo (aumento mínimo de cuatro veces del título entre el primer suero y el de convalecencia). En el contexto de un síndrome clínico compatible con rickettsiosis una determinación de Ac de tipo IgM puede ser muy sugestiva de rickettsiosis, aunque también se debe considerar que la detección de Ac de tipo IgM puede ser un falso positivo por la presencia de factores reumatoides tipo IgM y otras múltiples reacciones cruzadas. Existen en el mercado varios *kits* comerciales que utilizan antígenos de diferentes especies. Los más utilizados emplean *R. rickettsii*, *R. conorii* y *R. typhi*. En algunos laboratorios y en centros de referencia se pueden conseguir portaobjetos con otras especies de *Rickettsia*.

Es importante tener en cuenta que la IFI no permite identificar la especie de *Rickettsia* que está provocando la

reacción. Existen reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Rickettsia* e incluso con otros géneros bacterianos. Para una correcta interpretación de los resultados serológicos se debe tener en cuenta la historia clínica del paciente, así como los datos de reactividad basal de la población (sobre todo en zonas endémicas).

Para aumentar la especificidad de la técnica se ha recomendado la absorción de los Ac del suero provocados por infecciones previas con otras especies de *Rickettsia* (absorción cruzada), y posteriormente realizar la IFI, o utilizar diferentes antígenos y, en función de los títulos que se obtengan en la IFI, otorgar la responsabilidad de la infección a la especie que más reactividad provoque. El problema es que existe un gran número de “nuevas” especies y que habría que disponer de una gran cantidad de antígenos. En todo caso, los costos serían muy elevados y la técnica nunca será tan específica como el cultivo o los métodos moleculares. Existen otras técnicas serológicas basadas en la detección de Ac (ej: ELISA, Western-blot) que no se encuentran bien estandarizadas y que de momento no se han incorporado a la rutina de los laboratorios de microbiología clínica. En el anexo 1 se explica de forma detallada la metodología de realización de una IFI.

Cultivo de *Rickettsia*

El cultivo es la técnica diagnóstica más específica y, como tal, se considera la prueba de referencia o estándar de oro. Además, resulta fundamental para la obtención de antígenos y para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos. También es necesaria para establecer una nueva especie de *Rickettsia*. Sin embargo, el aislamiento de rickettsias mediante cultivo celular convencional a partir de una muestra procedente de un paciente con rickettsiosis, es un proceso muy laborioso y solamente realizado en laboratorios especializados. Las muestras deben manejarse como potencialmente peligrosas y se requiere un nivel 3 de bioseguridad.

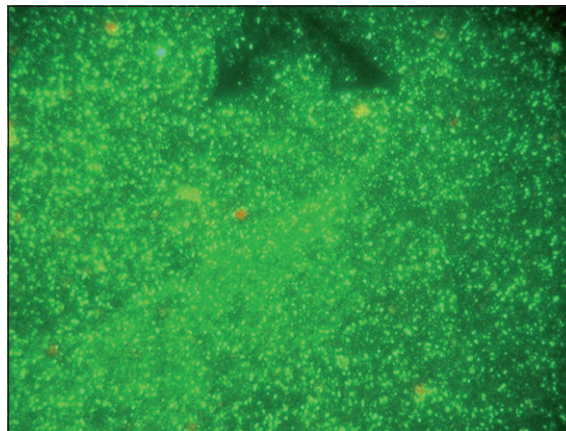


Figura 1. Visualización de rickettsias mediante microscopía de fluorescencia.

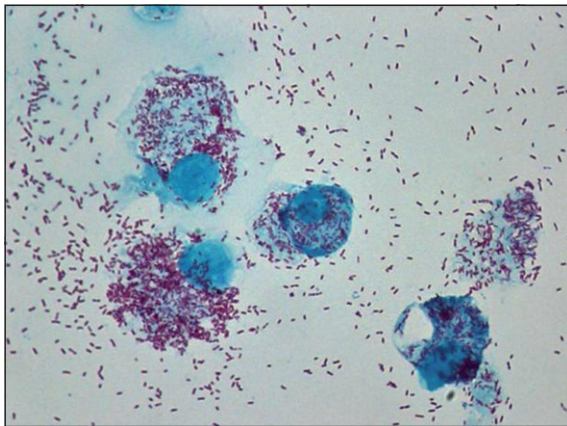


Figura 2. *Rickettsia* sp. en células Vero puestas de manifiesto mediante tinción de Giménez.

La muestra más adecuada para el cultivo de rickettsias es la sangre tratada con citrato o heparina (plasma y/o *buffy coat* o capa leucocitaria), pero también se pueden utilizar muestras de tejido (biopsias), otros líquidos estériles (LCR, etc.) o la propia garrapata^{19,20}. La muestra se debe recoger en tubos estériles (ej: Vacutainer) y mantenerla refrigerada el mismo día de la extracción y sin congelar. Si la muestra no se va a procesar de forma inmediata, se debe congelar a -80°C hasta su procesamiento (Tabla 1). No todas las especies de *Rickettsia* crecen con la misma facilidad. Así, mientras que *R. rickettsii* y *R. parkeri* son fáciles de aislar, otras especies son cultivadas con mucha dificultad y en raras ocasiones. La rentabilidad del cultivo se ve enormemente disminuida si las muestras se han obtenido una vez comenzado el tratamiento antimicrobiano. A lo largo de la historia, para llevar a cabo el crecimiento de las rickettsias en el laboratorio, se han empleado animales de laboratorio o huevos embrionarios, aunque en la actualidad se trabaja con líneas celulares. A este respecto, las líneas celulares más utilizadas son las VERO-E6 (ATCC CCL-81), fibroblastos L929 y también diferentes líneas celulares derivadas de artrópodos. El crecimiento de las rickettsias en estas líneas celulares es un proceso lento y además, el efecto citopático no es siempre visible, y en el caso de que se produzca, no es específico de especie. Se recomienda un equipamiento especial (laboratorio de bioseguridad 3) y personal muy entrenado. En la actualidad, el cultivo se debe complementar con técnicas moleculares para determinar específicamente la especie de *Rickettsia* aislada.

En los últimos años se está utilizando una adaptación del cultivo celular tradicional (centrifugación en *shell-vial* o cultivo celular rápido en tubo cerrado) que consiste en inocular la muestra sobre una monocapa de células susceptibles previamente crecidas sobre un portaobjetos circular y, posteriormente, realizar una centrifugación para facilitar que las rickettsias penetren en las células. En el anexo 2 se detalla la técnica. Mediante esta técnica se consigue aumentar la sensibilidad del cultivo (ya que se inocula la

misma cantidad de muestra pero en una superficie más pequeña) y acortar el tiempo de incubación. Después de 5-7 días de incubación se puede detectar la presencia de la bacteria mediante tinción de Giménez (Figura 2), IFI con anticuerpos específicos o mediante técnicas moleculares como la RPC y secuenciación. Esta técnica es más segura para el manipulador ya que se trabaja en un tubo cerrado y con menos volumen. En la actualidad se considera el método de elección si se pretende aislar una *Rickettsia* sp.

Detección molecular (RPC y secuenciación)

Los métodos moleculares basados en la RPC se han convertido en herramientas rápidas, sensibles y específicas para la detección e identificación de rickettsias en distintos tipos de muestras (sangre, biopsias cutáneas, LCR, exudados, raspado de escaras y garrapatas). Los genes más comúnmente analizados son el gen *gltA*, que codifica la enzima citrato sintetasa (presente en todas las rickettsias) y los que codifican dos proteínas de la membrana externa: *OmpA* (presente en todas las especies del GFM) y *OmpB* (presente en todas las especies excepto *R. bellii*). Existen otras posibles dianas diagnósticas más o menos específicas de *Rickettsia* spp., como el gen *htrA*, que codifica la proteína de superficie de 17kDa, el gen *sca4*, o el menos específico pero siempre presente gen ARNr 16S. En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los iniciadores (*primers*) utilizados en la identificación del género *Rickettsia* con sus correspondientes referencias (24-33). Una vez que se obtiene un resultado positivo se debe proceder a la secuenciación. Para llegar a la especie implicada resulta necesaria la utilización de más de una diana, sobre todo cuando se utilizan fragmentos cortos o dianas poco específicas. Inicialmente para el diagnóstico molecular se recomienda realizar un tamizaje con las dianas más sensibles (*gltA* y *ompB*). Por otro lado, las secuencias más específicas se obtienen mediante la utilización de *ompA*³⁴.

La secuencia de ácidos nucleicos se edita mediante el empleo de un *software* específico y se compara utilizando secuencias de referencia o bien directamente en GenBank mediante el programa BLAST, National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En el caso de que la muestra clínica de la que dispongamos sea una garrapata, antes de su procesamiento para la búsqueda de patógenos, es recomendable congelar medio ejemplar por la posibilidad de necesitarla para posteriores estudios. Los pasos a seguir se describen en el anexo 3.

La posibilidad de una contaminación por la utilización de controles positivos se debe tener presente, por lo que es recomendable emplear una especie de *Rickettsia* que no circule en Latinoamérica, por ejemplo, una rickettsia que esté sólo presente en Europa.



Tabla 2. Diagnóstico molecular de rickettsias. Dianas, iniciadores y condiciones de la reacción de polimerasa en cadena (RPC)

Diana utilizada (tamaño amplificado)	Secuencia de los iniciadores (5' 3')	Condiciones RPC			Ref.
Gen ARN 16S (426 pb)	fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG Rc16S.452n: AACGTCATTATCTTCCTTGC	95°C	2 min	1 ciclo	24,25
		95°C	20 seg		
		59°C	30 seg	30 ciclos	
		72°C	45 seg		
		72°C	5 min	1 ciclo	
Gen <i>ampA</i> (631 pb)	Rr190.70p: ATGGCGAATATTCTCCAAAA Rr190.701n: GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	95°C	3 min	1 ciclo	26,27
		95°C	20 seg		
		46°C	30 seg	35 ciclos	
		63°C	1 min		
		72°C	7 min	1 ciclo	
Gen <i>ampA</i> (532 pb)	Rr190.70p: ATGGCGAATATTCTCCAAAA Rr190.602n: AGTGCAGCATTGCTCCCCCT	96°C	30 seg	1 ciclo	28
		94°C	30 seg		
		50°C	30 seg	35 ciclos	
		72°C	45 seg		
		72°C	7 min	1 ciclo	
Gen <i>gltA</i> (381 pb)	RpCS.877p: GGGGGCCTGCTCACGGCGG RpCS.1258n: ATTGCCAAAAGTACAGTGAACA	95°C	1 min	1 ciclo	26
		95°C	20 seg		
		49°C	30 seg	35 ciclos	
		60°C	2 min		
		60°C	7 min	1 ciclo	
Gen <i>gltA</i> (337 pb)	RpCS.896p: GGCTAATGAAGCAGTGATAA RpCS.1233n: GCGACGTATACCCATAGC	95°C	5 min	1 ciclo	29
		95°C	15 seg		
		54°C	15 seg	35 ciclos	
		72°C	30 seg		
		72°C	3 min	1 ciclo	
Gen <i>gltA</i> (401 pb)	CS-78: GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT CS-323: GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	95°C	3 min	1 ciclo	30
		95°C	15 seg		
		48°C	30 seg	40 ciclos	
		72°C	30 seg		
		72°C	7 min	1 ciclo	
Gen <i>ompB</i> (511 pb)	rompB-OF:GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA rompB-OR:GCTTTATAACCAGCTAAACCACC	95°C	5 min	1 ciclo	29
		95°C	15 seg		
		54°C	15 seg	35 ciclos	
		72°C	30 seg		
		72°C	3 min	1 ciclo	
Gen <i>ompB</i> (420 pb)	rompB SFG-IF:GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA rompB SFG/TG-IR:GGTTTGGCCCATATACCATAAG	95°C	5 min	1 ciclo	29
		95°C	15 seg		
		56°C	15 seg	35 ciclos	
		72°C	30 seg		
		72°C	3 min	1 ciclo	
Gen <i>htrA</i> (434pb)	17kDa-1: GCTCTGCAACTTCTATGTT 17kDa-2: CATTGTCGTCAGGTTGGCA	94°C	3 min	1 ciclo	31,32
		94°C	1 min		
		48°C	5 min	35 ciclos	
		72°C	2 min		
		72°C	5 min	1 ciclo	
Gen <i>Sca4</i> (928pb)	D1f: ATGAGTAAAGACGGTAACCT D928r: AAGCTATTGCGTCATCTCCC	95°C	3 min	1 ciclo	33
		95°C	30 seg		
		50°C	30 seg	40 ciclos	
		68°C	90 seg		
		68°C	7 min	1 ciclo	

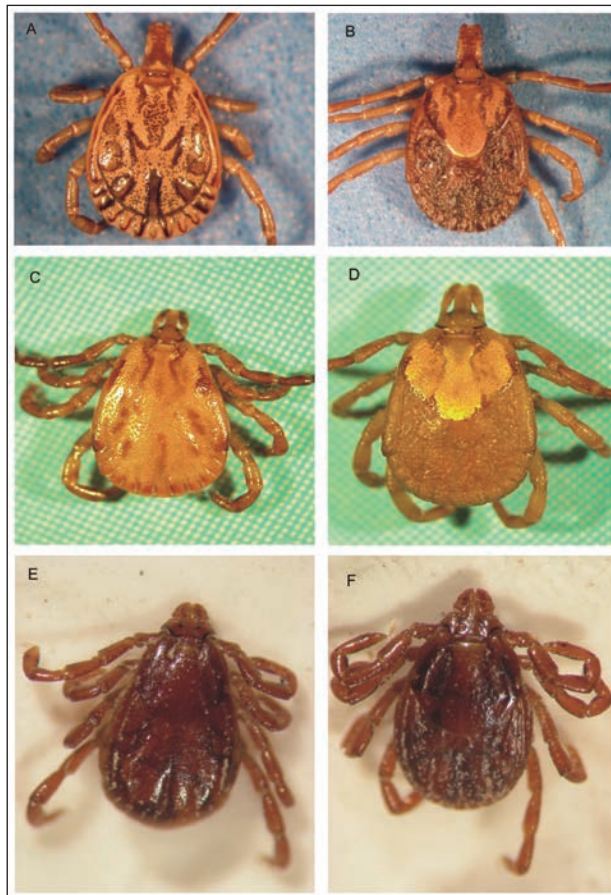


Figura 3. Garrapatas de la familia Ixodidae involucradas en la transmisión de rickettsias en Latinoamérica. **A)** Macho de *Amblyomma cajennense* sensu lato; **B)** Hembra de *Amblyomma cajennense* sensu lato; **C)** Macho de *Amblyomma aureolatum*; **D)** Hembra de *Amblyomma aureolatum*; **E)** Macho de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato; **F)** Hembra de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.



Figura 4. Garrapatas de la familia Ixodidae involucradas en la transmisión de rickettsias en Latinoamérica. **A)** Macho de *Amblyomma triste*; **B)** Hembra de *Amblyomma triste*; **C)** Macho de *Amblyomma ovale*; **D)** Hembra de *Amblyomma ovale*.

En los últimos años también se ha utilizado la RPC a tiempo real o RPC cuantitativa para la detección de rickettsias en muestras clínicas²³. Esta variante de la RPC permite amplificar y cuantificar de manera absoluta el producto de la reacción.

Principales garrapatas vectores de rickettsia en Latinoamérica

Las garrapatas (Acari: Ixodida) son ectoparásitos hematófagos de vertebrados terrestres, incluyendo animales domésticos y al hombre. La importancia sanitaria de las garrapatas radica en su capacidad para actuar como vectores de microorganismos patógenos como protozoos, rickettsias, espiroquetas y virus, y por su potencial para provocar toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores^{35,36}. Son consideradas, junto con los mosquitos, como los artrópodos vectores más importantes de agentes patógenos³⁵. Particularmente, en la región neotropical hay descritas 200 especies de garrapatas, de las cuales 116 pertenecen a la familia Ixodidae^{37,38} y 84 a la familia Argasidae^{37,39}. En Latinoamérica y el Caribe, las especies de garrapatas implicadas como vectores comprobados o potenciales de rickettsias están incluidas dentro de los géneros *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* y *Dermacentor*³, todos pertenecientes a la familia Ixodidae.

En el caso particular de las rickettsiosis humanas en Latinoamérica, las principales especies de garrapatas involucradas como vectores en la epidemiología de estas enfermedades son *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma triste*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma aureolatum* y *Rhipicephalus sanguineus*^{40,41}. Uno de los principales vectores de *R. rickettsii* en Latinoamérica es *A. cajennense* (Figuras 3A, 3B)³, cuya distribución abarca distintos ambientes ecológicos desde el sur de E.U.A. al norte de Argentina³⁷. Otros vectores de *R. rickettsii* son *A. aureolatum* (Figuras 3C, 3D), registrada en Argentina, Brasil, Guyana Francesa, Paraguay, Surinam y Uruguay, y *R. sanguineus* (Figuras 3E, 3F), un taxón cosmopolita también con capacidad para transmitir *R. massiliae*^{3,37}. Otras dos especies de la familia Ixodidae, *A. triste* (Figuras 4A, 4B) y *A. ovale* (Figuras 4C, 4D), han sido determinadas como vectores de *R. parkeri* en Sudamérica³. La primera está presente en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay, Venezuela, México y E.U.A.^{17,41,42}, mientras que *A. ovale* se distribuye en Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Trinidad y Tobago y Venezuela³⁷.

En el anexo 4 se muestran unas claves básicas que permiten llegar al género de las garrapatas que actúan como vectores de rickettsiosis en Latinoamérica.



Resumen

Las rickettsiosis transmitidas por garrapatas son afecciones de distribución mundial, que por diferentes motivos se pueden considerar emergentes y reemergentes. Hasta hace escasos años la única rickettsiosis transmitida por garrapatas en Latinoamérica era la infección por *Rickettsia rickettsii*, pero en la actualidad y fundamentalmente, gracias a la incorporación de nuevas herramientas para el diagnóstico microbiológico como la

reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación o el cultivo celular rápido en tubo cerrado, se han descrito e involucrado otras especies de *Rickettsia* en la producción de patología humana. En estas guías se detallan y describen las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico microbiológico de las rickettsiosis. Además, se incluye una sección en la que se detallan las especies más importantes de garrapatas duras relacionadas con las rickettsiosis en Latinoamérica, con claves para su clasificación taxonómica.

Anexo 1. Diagnóstico de Rickettsias. Protocolo para la realización del ensayo de IFI

1. Ajustar y mantener la incubadora a 37° C
2. Ordenar los sueros que se van a testar
3. Sacar de la nevera los reactivos para que se atemperen: fosfato-buffer-salino (PBS), portaobjetos que se vayan a utilizar y el conjugado
4. Preparar las diluciones de los sueros:
 - *1/64 (punto de corte): En un microtubo o placa de pocillos añadir 315 μ l de PBS y 5 μ l de suero. Mezclar bien
 - *1/128, 1/256, 1/512, 1/1024: Rotular una placa de predilución de 96 pocillos, indicando en la parte superior los números de los sueros y en el lateral las diluciones. Añadir 25 μ l de PBS en cada pocillo. Añadir al pocillo de la 1ª fila 25 μ l de la dilución 1/64 que ya tenemos preparada, mezclar y pasar 25 μ l al pocillo de la 2ª fila, mezclar y seguir hasta la dilución que queramos conseguir
5. Preparar una cámara húmeda colocando un papel de filtro humedecido en una caja cerrada
6. Añadir sobre cada pocillo del portaobjetos 25 μ l del suero a la dilución correspondiente. Es mejor añadir los sueros en los pocillos con el portaobjetos incluido en la cámara húmeda, para evitar derrames. En uno de los pocillos añadir 25 μ l de control positivo y en otro 25 μ l de control negativo
7. Incubar 30 min a 37°C
8. Lavar los portaobjetos en una cesta de tinciones con PBS (que queden todos los pocillos cubiertos) y dejar durante 10 minutos en agitación. Transcurrido el tiempo sacarlos de la cesta y aclarar con agua destilada
9. Repetir el punto 8
10. Dejar secar el portaobjetos al aire. Es muy importante que esté totalmente seco antes de añadir el conjugado
11. Añadir 25 μ l del conjugado a cada pocillo. Es conveniente añadirlo dentro de la cámara húmeda. Si hubiera que prepararlo añadir en un tubo PBS + conjugado humano marcado con fluoresceína (refrigerado) + azul de Evans, siguiendo las instrucciones del fabricante. Mezclar bien
12. Incubar 30 min a 37°C
13. Lavar como en el paso 8
14. Dejar secar el portaobjetos al aire
15. Cuando esté perfectamente seco añadir 2 ó 3 gotitas del medio de montaje (*mounting medium*) y colocar un cubreobjetos. Retirar el exceso del medio de montaje
16. Mirar al microscopio de fluorescencia a 40x



Anexo 2. Diagnóstico de rickettsias. Cultivo celular rápido o centrifugación en *shell-vial*

1. Inoculación de garrapatas

Los pasos 1-7 se pueden hacer fuera del P3:

1. Lavar las garrapatas con etanol al 70% y agua destilada
2. Cortar longitudinalmente la garrapata y congelar a -80°C la mitad que no se vaya a procesar
3. Triturar la mitad con 100 μ l de medio BHI y añadir posteriormente 700 μ l de BHI. (en total 800 μ l de BHI en cada media garrapata). Mezclar y centrifugar brevemente. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min
4. Retirar el medio de cada *shell-vial*.
6. Inocular 200 μ l en cada *shell-vial*
7. Introducir en el P3 los *shell-vial* ya inoculados, y los tubos con el medio de cultivo.

Una vez en el P3:

8. Centrifugar los *shell-vial* a 700 g durante 45 min
9. Incubar 1 h a 32-34°C.
10. Retirar el inóculo de cada *shell-vial*
11. Añadir 1 ml de medio limpio a cada *shell-vial*
12. Incubar en estufa a 32-34°C de 3 a 5 días
13. Comprobar el crecimiento de rickettsias mediante IFI y/o Giménez

2. Inoculación de sangre*/LCR

Los pasos 1-2 se puede hacer fuera del P3:

1. Retirar el medio de cada *shell-vial* en un tubo identificado igual que su *shell-vial* correspondiente
2. Inocular 200 μ l en cada *shell-vial*
3. Introducir en el P3 los *shell-vial* ya inoculados, y los tubos con el medio de cultivo

Una vez en el P3:

4. Centrifugar los *shell-vial* a 700 g durante 45 min
5. Incubar 1 h a 32-34°C
6. Retirar el inóculo de cada *shell-vial*
7. Lavar con 0,5 ml de medio limpio
8. Añadir 1 ml de medio limpio
9. Incubar en estufa a 32-34°C
10. Comprobar el crecimiento de rickettsias mediante IFI y/o Giménez

*La mejor muestra de sangre para inocular en el *shell-vial* es el plasma obtenido tras la centrifugación del tubo de sangre completa con heparina o el *buffy coat*

3. Inoculación de biopsias

Los pasos 1-7 se puede hacer fuera del P3:

1. Retirar el medio de cada *shell-vial*
2. Cortar media biopsia (si el tamaño lo permite) y congelar a -80°C la mitad que no se vaya a procesar
3. Triturar la muestra con 100 μ l de medio de cultivo limpio y añadir 700 μ l (en total 800 μ l de medio de cultivo limpio por cada biopsia)
4. Mezclar y centrifugar brevemente. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min
5. Inocular 200 μ l en cada *shell-vial*
6. Introducir en el P3 los *shell-vial* ya inoculados, y los tubos con el medio de cultivo

Una vez en el P3:

7. Centrifugar a 700 g durante 45 min
8. Incubar 1 hora a 32-34°C.
9. Retirar el inóculo de cada *shell-vial*
10. Añadir 1 ml de medio limpio a cada *shell-vial*
11. Incubar en estufa a 32-34°C
12. Comprobar el crecimiento de rickettsias mediante IFI y/o Giménez



Anexo 3. Diagnóstico de Rickettsias. Protocolo para la realización de la técnica de reacción de polimerasa en cadena (RPC)

1. Extracción de ADN

Extracción de ADN en garrapatas*

Mediante Kit comercial (QIAamp DNA Tissue® o similar):

1. Lavar con etanol al 70% y agua destilada estéril. Secar con papel de filtro
2. Colocar la garrapata en microtubos de 1,5 ml. Seguir las indicaciones del fabricante

Con hidróxido de amonio:

1. Colocar la garrapata en un microtubo 1,5 ml
2. Lavar en etanol al 70% y agua destilada estéril. Secar en papel de filtro
3. Si se trata de un ejemplar ingurgitado es conveniente realizar lavados en PBS estéril
4. Colocar en un tubo 100-150 μ l (dependiendo del tamaño de la garrapata, debe quedar totalmente cubierta) de hidróxido de amonio 0,7 M (1 ml de hidróxido de amonio 25% + 19 ml de agua estéril)
5. Hervir la garrapata durante 20 min a una temperatura aproximada de 100°C
6. Enfriar rápidamente en hielo y centrifugar brevemente
7. En una cabina de extracción de gases, colocar el tubo con la tapa abierta a 90°C en un termobloque durante 20 min para evaporar el amonio

*En caso de larvas y ninfas se extraerá el ADN de la garrapata entera. Para ejemplares adultos se cortará longitudinalmente en dos y se extraerá el ADN a partir de una de ellas. Si la garrapata está viva se puede extraer el ADN a partir de una gota de hemolinfa

Extracción de ADN en muestras clínicas (no garrapatas)

Las muestras humanas más adecuadas para el diagnóstico molecular de rickettsia son sangre tratada con citrato o EDTA, *buffy coat*, biopsia cutánea de la escara de inoculación e hisopado de la escara. Para la extracción de ADN de los fluidos se utiliza el Kit QIAamp DNA blood® o similar. Para biopsias cutáneas e hisopos se debe utilizar el kit "QIAamp DNA Tissue®" o similar. En ambos casos se seguirán las instrucciones del fabricante

2. RPC

2.1 Controles necesarios

- *Control positivo*: ADN de *Rickettsia* sp., a una dilución límite de detección para comprobar la eficacia de la amplificación de la RPC. Se utilizará el ADN de una especie de *Rickettsia* no presente en el área geográfica de donde proviene la muestra que se está procesando.
- *Control negativo de extracción*: extraer una muestra de agua en las mismas condiciones y a la vez que se extraen las muestras para analizar. Este control permite comprobar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de extracción
- *Control negativo de RPC*: se procesará en la reacción de RPC un tubo en el que se incluirán todos los reactivos excepto el ADN, que se sustituirá por agua. Este control permite comprobar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de amplificación

2.2 Condiciones de la RPC

Las condiciones de RPC dependen del fragmento amplificado y de los iniciadores. Las condiciones concretas para cada diana aparecen detalladas en la Tabla 2. En general, se pueden seguir los siguientes pasos:

- Un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 min
- 35-40 ciclos de amplificación en los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización a 95°C durante 15 s
 2. Hibridación (variable según la temperatura de hibridación de los iniciadores) durante 30 s
 3. Extensión a 72°C durante 30 s
- Un ciclo de extensión final de productos de RPC. Consiste en una incubación a 72°C durante 7 min

3. Electroforesis

- Preparar el gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1x
- Cargar el gel, añadiendo previamente el tampón de carga a las muestras. Utilizar uno de los pocillos para cargar el marcador de tamaño molecular
- Conectar la fuente de electroforesis a 100-150 V, de manera que no sobrepase 5 V/cm (considerando la distancia más corta entre los electrodos)
- Apagar la fuente cuando el colorante azul de bromofenol esté aproximadamente a la mitad del gel (aproximadamente 1 hora). Para visualizar los amplicones depositar el gel sobre un transiluminador con luz ultravioleta en un lugar oscuro

4. Lectura e interpretación

Para validar los resultados del ensayo, en el carril del control negativo no debe aparecer banda alguna y en el del control positivo debe aparecer una banda del tamaño esperado. Los resultados de RPC se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo. Todas las muestras que necesiten identificación de la especie de *Rickettsia* requieren secuenciación



Anexo 4. Clave para la identificación de los de los distintos géneros de garrapatas de la familia Ixodidae presentes en Latinoamérica y el Caribe¹

1a. Surco anal anterior al ano, ojos y festones ausentes	<i>Ixodes</i>
1b. Surco anal posterior al ano o ausente, festones usualmente presentes, ojos presentes o ausentes	2
2a. Ojos ausentes, escudo sin ornato, segmento II del palpo con una extensión lateral	<i>Haemaphysalis</i>
2b. Ojos presentes, escudo con ornato o sin ornato	3
3a. Escudo sin ornato, machos con dos placas ventrales, basis capituli dorsalmente hexagonal	<i>Rhipicephalus*</i>
3b. Escudo con o sin ornato, machos sin placas ventrales	4
4. Palpos tan largos como el basis capituli, segmento II y III del palpo similares en longitud	<i>Dermacentor</i>
5. Palpos más largos que el basis capituli	<i>Amblyomma</i>

¹Las claves dicotómicas refieren únicamente a los estadios adultos
 * Los machos del subgénero *Boophilus* con cuatro placas ventrales y sin festones.

Referencias bibliográficas

- Parola P, Paddock C D, Socolovschi C D, Labruna M B, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 657-702.
- Oteo J A, Portillo A. Tick-borne rickettsiosis in Europe. *Tick and tick-borne Diseases* 2012; 3: 270-7.
- Labruna M, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal J M, Dolz G, et al. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev MVZ Cordoba* 2011; 16: 2435-57.
- Portillo A, Oteo J A. Rickettsiosis as threat for the traveler. *Current Topics in Tropical Medicine*. Dr. Alfonso Rodríguez-Morales (Ed.), 2012 InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/rickettsiosis-as-threat-for-the-traveller>
- Hechemy K E, Oteo J A, Silverman D, Raoult D, Blanco J R. A Century of Rickettsiology: Emerging, reemerging rickettsioses, clinical, epidemiologic, and molecular diagnostic aspects and emerging veterinary rickettsioses. An overview. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1077: 1-14.
- Venzal J M, Portillo A, Estrada-Peña A, Castro O, Cabrera P A, Oteo J A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1493-5.
- Paddock C D, Sumner J W, Comer J A, Zaki S R, Goldsmith C S, Goddar J, et al. *Rickettsia parkeri*: A new recognized cause of spotted fever in the United States. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 805-11.
- Spolidorio M G, Labruna M B, Mantovani E, Brandao P E, Richtzenhain L J, Yoshinari N H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 521-3.
- McQuiston J H, Zemtsova G, Perniciario J, Hutson M, Singleton J, Nicholson W M, et al. Afebrile spotted fever group *Rickettsia* infection after a bite from a *Dermacentor variabilis* tick infected with *Rickettsia montanensis*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12: 1059-61.
- Raoult D. Introduction to Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis. In: Mandell, Douglas & Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL; Bennett JE; Dolin R. (Eds.) 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia, USA. 2010: pp. 2495-8.
- Walker D H. *Rickettsia rickettsii* and other spotted fever Group Rickettsiae (Rocky Mountain spotted fever and other spotted fevers). In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell GL; Bennett JE; Dolin R. (Eds.) 7th Ed. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia, USA. 2010; pp. 2499-508.
- Gillespie J J, Williams K, Shukla M, et al. Rickettsia phylogenomics: Unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PLoS One*. 2008; 3: e2018.
- Walker DH, Raoult D. (*Rickettsia prowazekii* (Epidemic or louse-borne typhus). In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell GL; Bennett JE; Dolin R. (Eds.) 7th Ed. Churchill Livingstone Elsevier Philadelphia, USA. 2010; pp. 2521-4.
- Pérez-Osorio CE, Zavala-Velázquez J E, Arias León J J, Zavala-Castro JE. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1019-23.
- Balcells M E, Rabagliati R, Garcia P, Poggi H, Oddó D, Concha M, et al. Endemic scrub typhus-like illness, Chile. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1659-63.
- Miranda J, Portillo A, Oteo JA, Mattar S. *Rickettsia* sp. strain colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): a new proposed *Rickettsia* detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) from iguanas and free-living larvae ticks from vegetation. *J Med Entomol* 2012; 49: 960-5.
- Abarca K, López J, Acosta-Jamett G, Lepe P, Soares J F, Labruna M B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile. *J Med Entomol* 2012; 49: 219-22.
- Chapman A S, Bakken J S, Folk S M, Paddock C D, Bloch K C, Krusell A, et al. Diagnosis and management of tick-borne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichiosis, and anaplasmosis-United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep* 2006; 55 (RR-4): 1-27.
- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles J, Bjoërsdjoff A, Blanco J R, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1108-32.
- Blanco J R, Jado I, Marin M, Sanfeliu I, Portillo A, Anda P, et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whippelii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26: 573-81.
- Bechah Y, Socolovschi C, Raoult D. Identification of Rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 83-6.
- World Health Organization (WHO). Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2013-2014. Disponible en: http://www.who.int/ihr/i_s_shipping_training/es/index.html
- Angelakis E, Richet H, Rolain J M, La Scola B, Raoult D. Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1540.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; 173: 697-703.



- 25.- Márquez F J, Muniaín M A, Soriguer R C, Izquierdo G, Rodríguez-Baño J, Borobio M V. Genotypic identification of an undescribed spotted fever Group Rickettsia in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 570-7.
- 26.- Regnery R L, Spruill C L, Plikaytis B D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991; 173: 1576-89.
- 27.- Roux V, Fournier P E, Raoult D. 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* 1996; 34: 2058-65.
- 28.- Oteo J A, Portillo A, Blanco J R, Ibarra V, Santibáñez S. *Rickettsia africae* infection. Three cases confirmed by PCR. *Med Clin* 2004; 122: 786-8.
- 29.- Choi Y J, Jang W J, Kim J Y, Ryu J S, Lee S H, Park K H, et al. Spotted fever group and typhus group Rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 237-44.
- 30.- Labruna M B, Whitworth T, Horta M C, Bouyer D H, McBride J W, Pinter A, et al. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 90-8.
- 31.- Webb L, Carl M, Malloy D C, Dasch G A, Azad A F. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 530-4.
- 32.- Oliveira R P, Galvao M A M, Mafra C L, Chamone C B, Calic S B, Silva S U, Walker D H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 317-9.
- 33.- Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1353-60.
- 34.- Santibáñez S, Portillo A, Santibáñez P, Palomar A M, Oteo J A. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31: 283-8.
- 35.- Sonenshine D E, Lane R S, Nicholson W L. 2002. Ticks (Ixodida). En: *Medical and Veterinary Entomology*. (GR Mullen, LA Durden Eds.) Academic Press, San Diego, USA. 2002. pp. 517-58.
- 36.- Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology* 2004; 129: S1-S12.
- 37.- Guglielme A A, Estrada-Peña A, Keirans J E, Robbins R G. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. International Consortium on Ticks and Tick-borne diseases (ICTTD-2), Atalanta, Houten, The Netherlands, 2003. ISBN 987-43-6828-4. 173 pp.
- 38.- Nava S, Mangold A J, Mastropaolo M, Venzal J M, Oscherov E B, Guglielme A A. *Amblyomma boeroi* n.sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of the Chacoan peccary *Catagonus wagneri* (Rusconi) (Artiodactyla: Tayassuidae) in Argentina. *Systematic Parasitol* 2009; 73: 161-74.
- 39.- Venzal J M, Nava S, Mangold A J, Mastropaolo M, Casas A, Guglielme A A. *Ornithodoros quilinensis* sp. nov. (Acari: Argasidae), a new tick species from the Chacoan region in Argentina. *Acta Parasitol* 2012; 57: 329-36.
- 40.- Labruna M B, Soares J F, Martins T F, Soares H S, Cabrera R R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental Applied Acarol* 2011; 54: 41-9.
- 41.- Mastropaolo M, Nava S, Guglielme A A, Mangold A J. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Experimental Applied Acarol* 2011; 53: 371-5.
- 42.- Nava S, Mangold A J, Mastropaolo M, Venzal J M, Fracassi N, Guglielme A A. Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Vet Parasitol* 2011; 181: 301-8.