



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

Quintero, Juan Carlos; Londoño, Andrés Felipe; Díaz, Francisco J.; Agudelo-Flórez, Piedad; Arboleda, Margarita; Rodas, Juan David

Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia

Biomédica, vol. 33, núm. 1, 2013, pp. 38-51

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84328376006>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULO ORIGINAL

## Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el norte de Antioquia, Colombia

Juan Carlos Quintero<sup>1</sup>, Andrés Felipe Londoño<sup>1</sup>, Francisco J. Díaz<sup>2</sup>, Piedad Agudelo-Flórez<sup>3</sup>, Margarita Arboleda<sup>3</sup>, Juan David Rodas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Medellín, Colombia

**Introducción.** Las rickettsias son bacterias patógenas usualmente transmitidas por ectoparásitos, como garrapatas, piojos o pulgas. En la última década se presentaron tres brotes de rickettsiosis con casos fatales en la región noroccidental de Antioquia y en un municipio limítrofe de Córdoba.

**Objetivo.** Describir la ecología y la epidemiología de las infecciones por *Rickettsia* spp. en el Urabá antioqueño.

**Materiales y métodos.** Se obtuvieron muestras de 354 roedores y se recolectaron 839 ectoparásitos de estos en los municipios de Apartadó, Turbo y Necoclí. Asimismo, se obtuvieron 220 sueros humanos. Estas muestras fueron estudiadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de infección por rickettsias.

**Resultados.** Por IFI se detectaron anticuerpos antirickettsias en 130 (43 %) de los roedores y en 53 (24 %) de los sueros humanos estudiados. Además, se amplificaron secuencias del gen *gltA* específicas del género *Rickettsia* en 23 (6,8 %) muestras de hígado de roedores, las cuales mostraron una similitud del 98,7 % con *R. prowazekii*. Una secuencia de *gltA* obtenida de larvas de garrapatas del género *Amblyomma* sp., tuvo una identidad mayor de 99 % con las secuencias de *R. tamrae*.

**Conclusión.** Estos resultados demuestran la circulación de rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en los municipios estudiados.

**Palabras clave:** *Rickettsia*, vectores de enfermedades, fiebre maculosa de las montañas rocosas, fiebre tifoidea, diagnóstico, Colombia

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.735>

### Ecoepidemiology of rickettsial infection in rodents, ectoparasites and humans in northeastern Antioquia, Colombia

**Introduction:** *Rickettsia* spp. are tick, flea or lice-borne pathogenic bacterium, usually carried by rodents. In the last decade three outbreaks of rickettsial disease including fatalities, occurred in the provinces of Antioquia and Córdoba in northwestern Colombia.

**Objective:** The purpose of this study was to perform an ecological and epidemiological description of the *Rickettsia* spp infection in the recently affected region of Colombia.

**Materials and methods:** Samples were obtained from 354 rodents and their parasites captured in the municipalities of Apartadó, Turbo and Necoclí. Likewise, 220 human sera were also collected, for detection of infection by *Rickettsia* spp.

**Results:** Indirect immunofluorescence assay (IFA) revealed that 130 (43%) of the rodents and 53 (24%) of the humans produced antibodies to *Rickettsia* spp. Additionally, rickettsial DNA was amplified by PCR from 23 (6.8%) rodent liver samples using primers directed to the genus specific *gltA* gene. While *gltA* sequences from rodent samples exhibited a 98.7% similitude with *R. prowazekii*, a sequence amplified from larvae of *Amblyomma* sp exhibited identities of >99% similarity with *R. tamrae*.

**Contribución de los autores:**

Juan Carlos Quintero contribuyó con el diseño del estudio, la elaboración de las pruebas diagnósticas en laboratorio, participó en las salidas de campo, realizó la clasificación taxonómica de ectoparásitos y desarrolló el análisis.

Andrés Felipe Londoño participó en el diseño del estudio, las salidas de campo y la clasificación taxonómica de pequeños mamíferos.

Francisco Javier Díaz llevó a cabo el análisis filogenético y contribuyó al análisis.

Piedad Agudelo-Flórez colaboró en el diseño del estudio.

Margarita Arboleda realizó la revisión médica de pacientes sintomáticos en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical.

Juan David Rodas participó en el diseño del estudio, las salidas de campo y el análisis.

Todos los autores participaron en la revisión y discusión del manuscrito final.

**Conclusion:** These results demonstrate the presence of rickettsia in rodents, ectoparasites and humans throughout the municipalities studied.

**Key words:** *Rickettsia*, disease vectors, Rocky Mountain spotted fever, typhoid fever, diagnosis, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.735>

Las rickettsias son bacterias Gram negativas pequeñas que se reproducen intracelularmente y que producen infecciones sistémicas con compromiso prominente del endotelio vascular, lo cual conduce a enfermedades de gravedad variable, algunas de ellas potencialmente fatales, como el tifus epidémico y la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (1). Las rickettsias son transmitidas por vectores artrópodos, principalmente garrapatas, ácaros, piojos y pulgas (1,2), aunque también se ha demostrado la transmisión por medio de aerosoles (3). Los roedores, tanto silvestres como sinantrópicos, son huéspedes frecuentes de estos artrópodos, especialmente durante sus estadios inmaduros, lo cual los convierte en potenciales reservorios de rickettsias.

El género *Rickettsia* pertenece a la familia Rickettsiaceae, del orden Rickettsiales. Este género se subdividió recientemente en cuatro grupos, conocidos como: el grupo de la fiebres manchadas (*Spotted Fever Group*), en el cual se encuentran las especies *R. rickettsii*, *R. conorii* y *R. peacockii*, entre otras; el grupo de los tifus dentro del cual se encuentran *R. typhi* y *R. prowazekii*; el grupo transicional conformado por *R. felis* y *R. akari*; y por último, el grupo ancestral que incluye a *R. canadensis* y *R. bellii* (1).

En Colombia, las enfermedades causadas por rickettsias fueron descritas por primera vez en 1937, cuando se presentó un brote epidémico de un síndrome febril grave, el cual tuvo una letalidad del 95 % en el municipio de Tobia, Cundinamarca. En ese entonces, se identificaron bacterias que parecían corresponder a *Rickettsia* spp. como el agente causal del síndrome, y a la forma clínica observada se le llamó fiebre de Tobia (4). A pesar de la alta letalidad de dicho brote, en los siguientes 70 años no se reportaron otros casos y solo en el 2005 se hizo un estudio serológico en Villetá (Cundinamarca), el cual arrojó, una seroprevalencia de 40,3 % en personas sanas, lo que indicaba la

#### Correspondencia:

Juan David Rodas, Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, SIU, laboratorio 233, Universidad de Antioquia, Carrera 53 N° 61-30, Medellín, Colombia.

Telefax: (574) 219 6525

[juandavid.rodas@gmail.com](mailto:juandavid.rodas@gmail.com)

Recibido: 10/05/12; aceptado: 02/09/12

permanencia del agente y la frecuente exposición al mismo en esa región (5).

En años recientes se presentaron tres brotes sucesivos de enfermedad por rickettsias en los municipios de Necoclí (Antioquia, 2006), Los Córdobas (Córdoba, 2007) y Turbo (Antioquia, 2008), todos ellos en el noroeste de Colombia. Estos se manifestaron como síndromes febriles, acompañados de hipotensión, choque y falla respiratoria aguda, y tuvieron una gran letalidad. En todos ellos se identificó *R. rickettsii* como el agente causal de los casos fatales (6-8). A partir de estos brotes se llevó a cabo un estudio exploratorio de factores de riesgo para rickettsiosis en Necoclí, en el cual se encontró una seroprevalencia de anticuerpos IgG antirickettsias de 29,2 % y un mayor riesgo para la población que habita en zonas rurales (7). Por otra parte, en un estudio conducido en el 2008 en el departamento de Caldas, se encontraron anticuerpos contra *R. typhi* en 14 de 120 pacientes con síndrome febril y con reacción positiva de Weil-Félix (9).

Los anteriores reportes evidencian la presentación de rickettsiosis en Colombia, en ocasiones con una alta letalidad, y muestran que es necesario emprender estudios que describan los factores que favorecen la aparición de los brotes. En particular, es urgente identificar los huéspedes vertebrados e invertebrados que mantienen el ciclo enzoótico de estas bacterias, así como las condiciones que favorecen su transmisión a los humanos, con el propósito de mejorar la comprensión, la vigilancia epidemiológica y el control de la enfermedad.

#### Materiales y métodos

##### *Ubicación geográfica*

El trabajo se llevó a cabo en tres municipios del Urabá antioqueño: Apartadó, Turbo y Necoclí, los cuales se ubican a 344, 373 y 424 km al noroeste de Medellín, y una altitud de 25, 3 y 8 msnm, respectivamente. La temperatura y la precipitación promedio para los tres municipios son de 28 °C y de 2.500 mm.

##### *Captura y toma de muestra de roedores*

Se capturaron roedores silvestres y sinantrópicos en zonas rurales y urbanas de los tres municipios

previamente mencionados. Las capturas se hicieron con trampas tipo Tomahawk y Sherman, cebadas con hojuelas de avena, esencia de vainilla y mantequilla de maní (10).

Con el fin de obtener un buen nivel de confianza en los resultados, y ante la ausencia de datos exactos sobre el universo de estudio, el muestreo se basó en una población de más de 100.000 roedores, probablemente mayor a la real, tomando como límite de confianza el 95 % y aceptando un error del 5 %, se estimó una muestra de 333 especímenes. Las capturas se hicieron durante una semana cada mes, por un periodo de 14 meses. Las muestras se tomaron tal como fue descrito por Londoño, et al. (11). Brevemente, a los roedores capturados se les anestesió con una mezcla de ketamina y xilazina. Se registraron variables tales como peso, sexo y medidas corporales (10), y se identificó la especie por métodos morfométricos de acuerdo con las claves taxonómicas disponibles (12-16). Los roedores se clasificaron con la colaboración del Laboratorio de Mastozoología de la Universidad de Antioquia. Igualmente, se tomó una muestra de sangre por punción cardiaca, para detectar anticuerpos antirickettsias.

Los animales capturados, aún anestesiados, se sometieron a eutanasia con una sobredosis de pentotal sódico y, posteriormente, se les extrajo el hígado, que fue usado para obtener el ADN.

#### **Colección de ectoparásitos**

Los ectoparásitos presentes en los animales fueron recolectados, identificados y transportados, según los protocolos recomendados por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (17). Los ectoparásitos se clasificaron en el Laboratorio de Entomología del grupo PECET de la Universidad de Antioquia, utilizando claves taxonómicas previamente descritas (18,19).

#### **Extracción y amplificación del material genético**

Las muestras de hígado obtenidas de los roedores capturados se procesaron para la extracción de ADN, utilizando un método basado en columnas de sílica gel (QIAamp DNA Mini Kit™, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Igualmente, se extrajo ADN de los ectoparásitos, en forma individual para los adultos previamente clasificados de acuerdo con su especie, sexo, huésped y procedencia. Los artrópodos en estadios inmaduros se distribuyeron en grupos, cuando fueron recolectados del mismo roedor y pertenecían al mismo grupo taxonómico.

El ADN obtenido de roedores y de vectores se amplificó, usando Supermix® (Invitrogen, Brasil), para evidenciar la presencia o ausencia del ADN de rickettsias (17). Se hicieron dos amplificaciones por reacción en cadena de polimerasa (PCR), la primera con cebadores para el gen de la citrato-sintasa (*gltA*) común a todos los miembros del género *Rickettsia*, y la segunda, con cebadores para el gen *ompA* específico de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (20).

#### **Análisis filogenético**

Los productos de la PCR del gen *gltA* fueron enviados para su secuenciación en un servicio comercial (Macrogen, Corea). Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias homólogas de otras rickettsias disponibles en el GenBank, utilizando el programa Clustal X (21). Los métodos filogenéticos empleados fueron el análisis de probabilidades bayesianas con el modelo de substitución general con tiempo reversible y el análisis por distancias genéticas con el algoritmo de *neighbor-joining* con las distancias estimadas según el modelo de sustitución de Hasegawa-Kishino-Yano. Estos análisis se hicieron con los programa MrBayes 3.1.2 y PAUP v. 4.10, respectivamente (22).

#### **Selección y muestreo de humanos**

El estudio en la población humana se hizo en pacientes que acudían a la sede del Instituto Colombiano de Medicina Tropical, ubicada en el Hospital Regional de Apartadó, o a los hospitales locales de Turbo y Necoclí. Los participantes se seleccionaron por conveniencia, ingresando al estudio los individuos que se ajustaran a alguno de los siguientes criterios de inclusión: a) pacientes con historia de síndrome febril indiferenciado de, al menos, una semana de evolución, con prueba de gota gruesa negativa para malaria; b) pacientes con síndrome febril y cuadro respiratorio agudo o con evidencia radiológica de infiltrado intersticial pulmonar que requirieran asistencia respiratoria; y c) pacientes con fiebre y trastornos hemorrágicos.

A los pacientes que cumplían con alguno de estos criterios se les tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para obtener suero, el cual se almacenó a -20 °C hasta su análisis. En la medida de lo posible, se tomaron dos muestras para estos estudios serológicos, la primera durante la fase aguda o sintomática, y la segunda, correspondiente a la fase de convalecencia, 15 a 20 días después de la primera muestra.

### **Prueba serológica**

La detección de anticuerpos de tipo IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, tanto en muestras de suero de humanos como de roedores, se llevó a cabo por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se usaron placas de múltiples pozos sensibilizadas con antígeno de *R. rickettsii*. A cada pozo se le adicionaron 10 µl del suero en una dilución de 1:64. Después de incubar durante 30 minutos a 37 °C y de dos lavados, se adicionó una gota de anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína correspondiente a la especie evaluada (anti-IgG humana, anti-IgG de rata o anti-IgG de ratón, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por pozo. Después de un nuevo periodo de incubación y de nuevos lavados, se hizo una contratinación con azul de Evans y se leyó en un microscopio de fluorescencia. En cada placa se incluyeron sueros de control negativo y positivo. Se consideraron positivos los sueros que reaccionaron en una dilución de 1:64. Las muestras pareadas con resultados positivos fueron tituladas hasta la máxima dilución reactiva (23,24).

### **Análisis estadístico**

Se hizo un análisis descriptivo de la infección por rickettsias en los roedores, ectoparásitos y humanos.

Se tuvieron en cuenta las siguientes variables: en roedores, sexo, género, edad, especie, presencia o ausencia de ectoparásitos, fecha de captura, municipio, zona geográfica y sitio específico donde se colocaron las trampas; en humanos, sexo, edad, municipio de consulta médica, lugar de residencia, ocupación, convivencia con animales, disposición de basuras, presencia o ausencia de alcantarillado, roedores en sus viviendas y exposición a ectoparásitos.

También, se hizo un análisis factorial de correspondencia múltiple para asociar las frecuencias de infección con las variables evaluadas en los humanos y roedores, donde las variables categóricas activas fueron: presencia o ausencia de la infección detectada por PCR o por IFI, y presencia o ausencia de ectoparásitos. Las variables categóricas suplementarias fueron todas las tenidas en cuenta en los pacientes muestreados y en roedores antes mencionadas. Los análisis estadísticos descriptivos se hicieron en el paquete estadístico SAS™ (25) y, el análisis factorial de correspondencia múltiple, en el paquete SPAD™, versión 5.6 (26).

### **Aspectos éticos**

Los procedimientos llevados a cabo en humanos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Igualmente, el Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad Antioquia y la Corporación Ambiental Regional, Corpourabá, aprobaron los procedimientos de captura y muestreo realizados en los roedores en la zona de estudio.

### **Resultados**

#### **Identificación de roedores capturados**

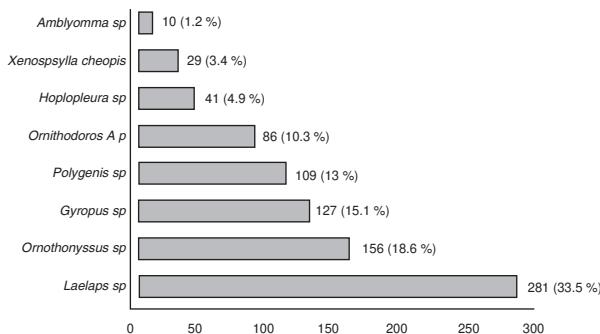
El muestreo de roedores de este estudio, es el mismo descrito por Londoño, *et al.*, para la detección de virus transmitidos por roedores (11). Brevemente, durante 56 noches de muestreo con 66 trampas, se capturaron 354 roedores en los tres municipios (Apartadó, Turbo y Necoclí), lo que representó un éxito de captura del 9,6 %. De los animales obtenidos, 124 (35%) fueron clasificados como *Rattus rattus*, 24 (6,8 %), como *Rattus norvegicus*, 71 (20,1 %), como *Mus musculus*, 109 (30,7 %), como *Zygodontomys cherrei*, 22 (6,2 %), como *Proechimys semispinosus*, y 4 (1,1 %), como *Heteromys anomalus*.

#### **Identificación de ectoparásitos**

Se recolectaron 839 ectoparásitos en 94 roedores, de los cuales, 96 (11,4 %) eran garrapatas, 138 (16,4 %) pulgas, 168 (20,0 %) piojos, y 437 (52,1 %) ácaros. La mayoría de las garrapatas recolectadas estaban en estadio de larva y correspondían a garrapatas blandas (familia Argasidae) que fueron clasificadas en la especie *Ornithodoros (Alesterobius) puertoricensis*. Las demás fueron larvas y ninfas de garrapatas duras (familia Ixodidae), todas ellas del género *Amblyomma* spp. Las pulgas recolectadas se clasificaron como *Xenopsylla cheopis* y *Polygenis* sp. Los piojos se clasificaron dentro de los géneros *Gyropus* sp. y *Hoplopleura* sp. y, por último, los ácaros se identificaron como pertenecientes a los géneros *Laelaps* sp. y *Ornithonyssus* sp. (figura 1).

#### **Distribución de los ectoparásitos recolectados en los roedores capturados**

Las garrapatas blandas (familia Argasidae) fueron casi exclusivamente recolectadas de especímenes del género *Ratus* y las duras (principalmente larvas y ninfas de la familia Ixodidae y género *Amblyomma* sp.) se encontraron en roedores *Z. cherrei* y *P.*



**Figura 1.** Número de ectoparásitos recolectados en roedores distribuidos por especie

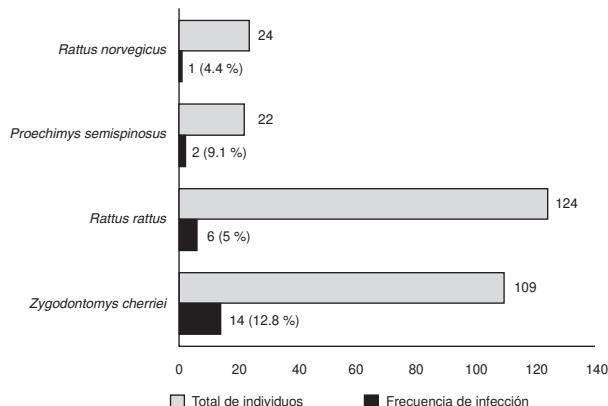
*semiespinosus*. Las pulgas *Xenopsylla cheopis* se detectaron únicamente en *R. norvegicus* y las del género *Polygenis* spp. se encontraron uniformemente distribuidas en casi todas las especies de roedores capturados. Finalmente, los piojos del género *Gyropus* sp. solo se recolectaron de *Z. cherrei* y *P. semiespinosus*, y los del género *Hoplopleura* sp., únicamente de *Z. cherrei*, pero los ácaros (*Laelaps* sp. y *Ornithonyssus* sp.) se recolectaron de casi todas las especies de roedores capturados (no se presentan los datos).

#### Frecuencia de infección por *Rickettsia* spp. en roedores

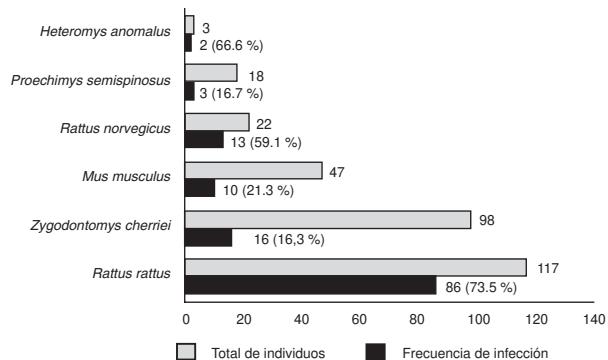
Se extrajo ADN de muestras de hígado de 335 roedores, a las cuales se les practicó PCR para el gen *gltA*. De estas muestras, 23 fueron positivas, resultando en una frecuencia de infección del 6,8 %. Todos los roedores positivos procedían del corregimiento Las Changas del municipio de Necoclí, excepto un *R. norvegicus* que fue capturado en la zona urbana del municipio de Turbo. Todas las especies de roedores capturadas fueron positivas en algún grado, excepto *M. musculus* y *H. anomalus*. En la figura 2 se presentan los números y frecuencias de infección por PCR en cada una de las especies de roedores. Además, mediante IFI se midió la frecuencia total y por especie de los anticuerpos IgG antirickettsias en los roedores capturados. La frecuencia total de infección para los animales recolectados fue de 43 % y las frecuencias discriminadas por especie se presentan en la figura 3.

#### Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos por los métodos bayesiano y de *neighbor-joining* de las secuencias del gen *gltA*, fueron congruentes y permitieron clasificar las secuencias obtenidas dentro de los grupos de rickettsias previamente establecidos. En la figura



**Figura 2.** Número de individuos estudiados y frecuencia de infección por rickettsias determinada por PCR en las diferentes especies de roedores



**Figura 3.** Número de individuos estudiados y frecuencia de infección por rickettsias determinada por IFI en las diferentes especies de roedores

4 se presenta el árbol filogenético obtenido por análisis bayesiano. Las secuencias amplificadas a partir de hígado de siete roedores, fueron idénticas entre sí y formaron un grupo monofilético con gran soporte de la rama, tanto por bootstrap (89 %) como por probabilidad posterior (0,98). Estas secuencias aparecen dentro de las rickettsias del grupo de los tifus y exhiben una similitud de 98,7 % y 94,4 % con las secuencias homólogas de *R. prowazekii* y *R. thypi*, respectivamente. La única secuencia obtenida de las larvas de *Amblyomma* spp. encontradas en un *P. semispinosus* se agrupó monofiléticamente con las secuencias de *R. tamrae* y *R. monacensis*, con las cuales compartía identidades de 99,5 % y 99,2 %, respectivamente (figura 4). Todas las secuencias empleadas en estos análisis fueron enviadas al *GenBank* para su publicación y recibieron los siguientes números de acceso: roedores: Rickettsias Colombia Turbo\_31JX519576, Rickettsias Colombia Necocli\_181 JX519577, Rickettsias Colombia Necocli\_182 JX519578, Rickettsias Colombia Necocli\_183

JX519579, Rickettsias Colombia Necocli\_198 JX519580, Rickettsias Colombia Necocli\_202 JX519581, Rickettsias Colombia Necocli\_252 JX519582L; garrapatas: Rickettsias Colombia Necocli\_190 JX519583.

### **Asociación entre infección por rickettsias y otras variables obtenidas de los roedores**

Las frecuencias de los roedores positivos para rickettsias por PCR y por IFI, teniendo en cuenta todas las variables consideradas para el análisis, se distribuyeron como se muestra en el cuadro 1.

En el análisis factorial de correspondencia múltiple (figura 5), se encontró que la variable activa “presencia de infección” en los roedores se asoció significativamente ( $p<0,01$ ) con las siguientes variables suplementarias: fecha de captura (junio de 2008), municipio (Necoclí), sitio de captura (cultivo), zona de captura (rural) y especie (*Z. cherriei*). La variable activa “ausencia de infección”, a su vez, se asoció ( $p<0,01$ ) con las variables suplementarias municipio (Turbo) y zona de captura (urbana). La presencia de anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, se relacionó significativamente ( $p<0,01$ ) con la especie (*R. rattus*), el sitio de captura (casa o bodega), la zona de captura (urbana), la ausencia de ectoparásitos y la fecha de captura (marzo de 2008). Además, la presencia de ectoparásitos se asoció ( $p<0,01$ ) con las especies de roedores (*P. semispinosus*, *Z. cherriei* y *R. norvegicus*), el sitio de captura (bosque y cultivo), la zona de captura (rural), el municipio (Necoclí) y las fechas de captura (septiembre de 2008 y marzo de 2009).

### **Frecuencia de la infección por *Rickettsia spp.* en ectoparásitos**

Todas las muestras de ectoparásitos recolectados de los roedores fueron analizadas por PCR en forma individual o agregadas en grupos, dependiendo de la cantidad de individuos recolectados por animal, y según el sexo, la especie del parásito y el roedor del cual se había obtenido (cuadro 2). Solo una muestra, consistente en dos larvas del género *Amblyomma* spp. capturadas de un roedor silvestre de la especie *P. semispinosus*, fue positiva para los genes *gltA* y *OmpA* de rickettsias.

### **Seroprevalencia de anticuerpos y frecuencia de seroconversión a *Rickettsia spp.* en pacientes sintomáticos**

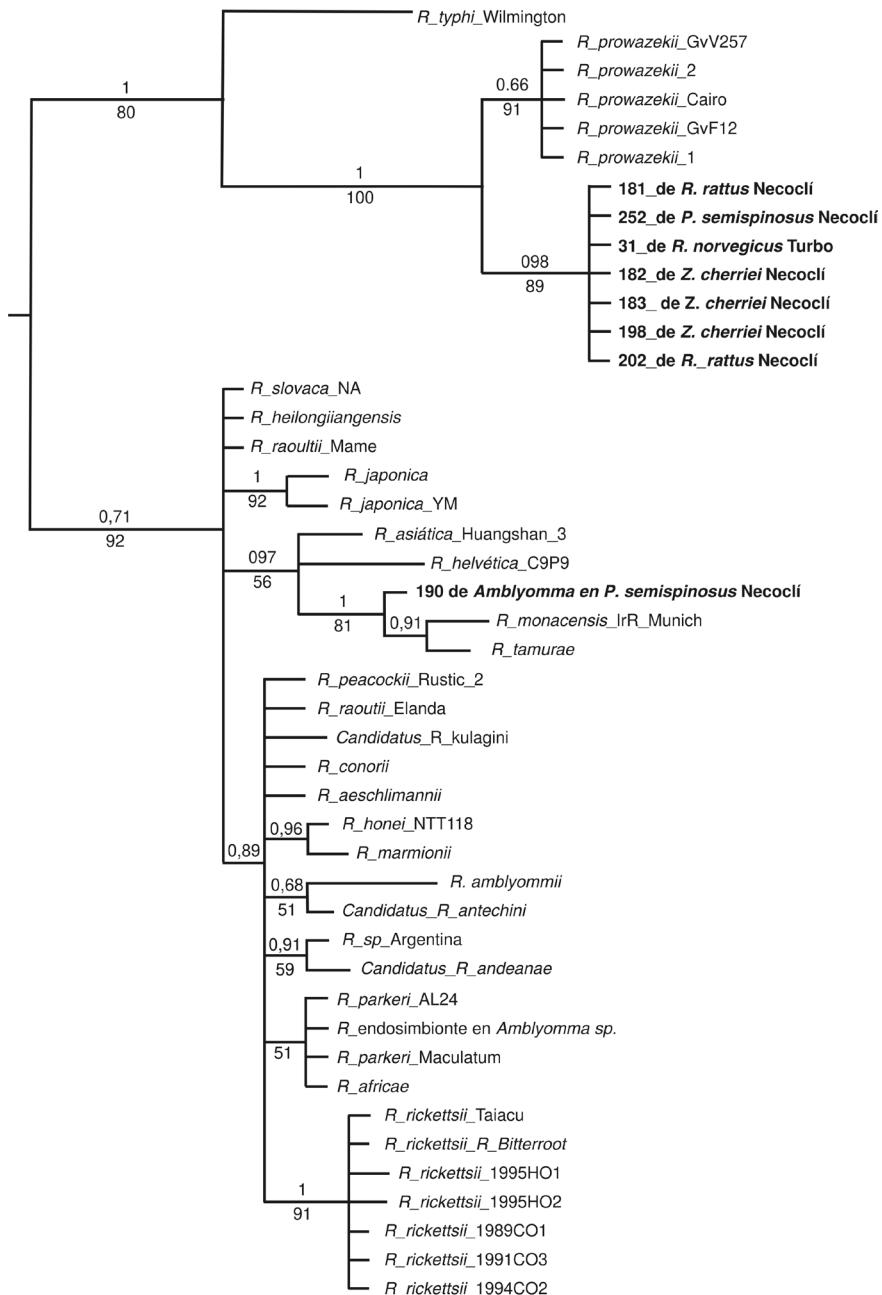
De 220 humanos estudiados, 53 (24,1 %) fueron positivos para IgG anti-rickettsias del grupo de las

**Cuadro 1.** Caracterización y distribución de las variables activas (dependientes) y suplementarias (independientes) estudiadas en los roedores capturados

Variables en roedores	(%) n=335	PCR + (%) n=23	IFI + (%) n=126
<b>Sexo</b>			
Macho	54,93	52,17	53,97
Hembra	45,07	47,83	46,03
<b>Zona de captura</b>			
Rural	45,37	73,91	33,33
Urbana	54,63	26,09	66,67
<b>Sitio de captura</b>			
Basurero	0,6	0	1,59
Bodega	23,88	17,39	30,95
Bosque	7,16	8,7	3,17
Casa	34,93	13,04	48,41
Cultivo	31,34	60,87	14,29
Peridomicilio	2,09	0	1,59
<b>Edad</b>			
Adulto	71,04	73,91	64,29
Juvenil	14,93	21,74	19,05
Subadulto	14,03	4,35	16,67
<b>Recolección de ectoparásitos</b>			
Sí	27,76	34,78	23,02
No	72,24	65,22	76,98
<b>Municipio de captura</b>			
Apartadó	2,39	0	2,38
Necoclí	69,25	95,65	76,19
Turbo	28,36	4,35	21,43
<b>Especies</b>			
<i>Rattus rattus</i>	35,52	26,09	66,67
<i>Rattus norvegicus</i>	6,87	4,35	9,52
<i>Mus musculus</i>	17,31	0	5,56
<i>Heteromys anomalus</i>	1,19	0	1,59
<i>Zygodontomys cherriei</i>	32,54	60,87	14,29
<i>Proechimys semispinosus</i>	6,57	8,7	2,38
<b>Fecha de captura</b>			
Agosto de 2007	1,49	0	0,79
Septiembre de 2007	2,09	13,04	4,76
Octubre de 2007	0,6	0	1,59
Noviembre de 2007	2,69	0	0,79
Diciembre de 2007	1,19	0	2,38
Enero de 2008	11,94	4,35	11,90
Febrero de 2008	8,96	0	4,76
Marzo de 2008	4,78	0	8,73
Abril de 2008	4,48	0	3,17
Mayo de 2008	10,75	8,7	11,11
Junio de 2008	16,72	56,52	16,67
Julio de 2008	13,73	17,39	15,87
Septiembre de 2008	14,33	0	15,08
Marzo de 2009	6,27	0	2,38

fiebres manchadas a la dilución de 1:64 (figuras 6 y 7).

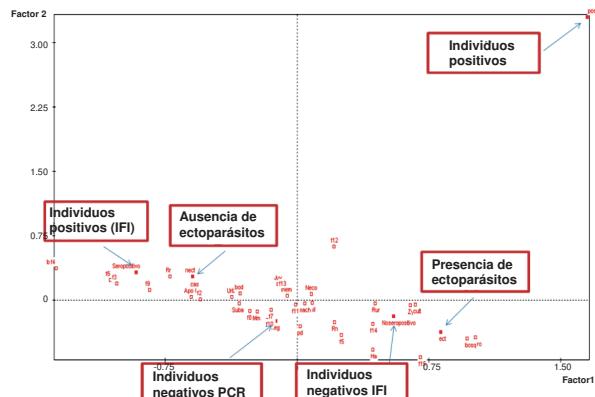
En 26 de los pacientes positivos se disponía de una muestra de la fase de convalecencia y se titularon sus anticuerpos. En seis (23,1 %) de estos sueros pareados, se observó un alza cuádruple o mayor



**Figura 4.** Análisis filogenético bayesiano del gen *gltA* de rickettsias. Las dos ramas principales corresponden al grupo de los tifus (arriba) y de las fiebres manchadas (abajo). Los nombres en negrita corresponden a las secuencias obtenidas en este estudio, denominadas según la especie y el municipio en los cuales se obtuvo muestra. El árbol está enraizado en el punto medio. El análisis se hizo con MrBayes 3.1.2, utilizando el modelo de evolución GTR+G, y fue corrido por 2'000.000 generaciones. Los números encima y debajo de las ramas son las probabilidades posteriores del análisis bayesiano y el valor de “bootstrap” obtenido por *neighbor-joining*, respectivamente.

del título de anticuerpos antirickettsias (cuadro 3). Este hallazgo evidenció infección reciente por rickettsias al momento de la consulta. Uno de estos pacientes (Nº 202 en el cuadro) era un niño de siete años del corregimiento Las Changas de Necoclí. Otro (Nº 94) era un joven de 20 años

que provenía de la zona urbana de Apartadó. Los demás casos corresponden a pacientes de Turbo. Dos de ellos fueron reactivos hasta una dilución de 1:131.072 Nº 58 y 60, cuadro 3). Estos dos eran agricultores procedentes del corregimiento Alto de Mulatos y de la vereda Caracolí del municipio de



**Figura 5.** Análisis factorial de correspondencia múltiple de las variables estudiadas para la infección por *Rickettsia* spp. en roedores

**Cuadro 2.** Frecuencias de infección por *Rickettsia* spp. en ectoparásitos detectadas por PCR para los genes *gltA* (citrato-sintasa) y *ompA*

Ectoparásito	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>
<i>Amblyomma</i> spp.	1/10	1/10
Larvas	1/5	1/5
Ninfas	0/5	0/5
<i>Ornithodoros A. puertoricencis</i>	0/80	0/80
Larvas	0/80	0/80
<i>Polygenis</i> spp.	0/104	0/104
Machos	0/37	0/37
Hembras	0/67	0/67
<i>Xenopsylla cheopis</i>	0/29	0/29
Machos	0/16	0/16
Hembras	0/13	0/13
<i>Gyropus</i> sp.	0/127	0/127
<i>Hoplopleura</i> sp.	0/41	0/41
<i>Ornithonyssus</i> sp	0/156	0/156

Turbo. Sólo hubo una mujer entre los pacientes con seroconversión, una ama de casa de 55 años de edad procedente del barrio Julio Orozco del municipio de Turbo (Nº 14, cuadro 3).

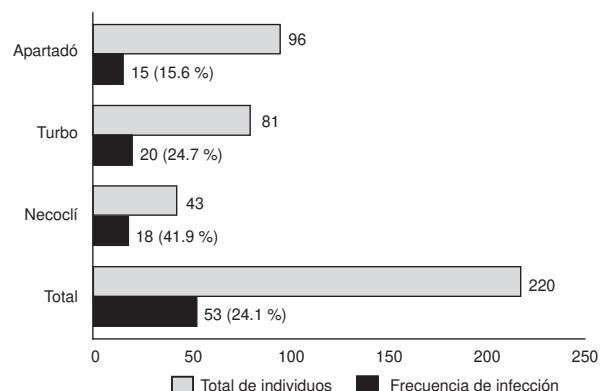
#### Asociación entre las frecuencias de infección por rickettsias y variables en humanos

Las variables tenidas en cuenta en los humanos, se distribuyeron como se muestra en el cuadro 4. De igual manera, los datos de frecuencia de infección de los individuos muestreados y el diagnóstico de rickettsiosis (seroconversión en muestras pareadas), se describen en el mismo cuadro.

En el análisis factorial de correspondencia múltiple se encontró que la variable activa frecuencia de infección (positivos por IFI) se asoció significativamente ( $p<0,01$ ) con el inicio de signos clínicos en marzo de 2008, con la consulta en

**Cuadro 3.** Títulos de anticuerpos en pacientes con signos clínicos y con aumento significativo para el antígeno de *Rickettsia rickettsii* por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Títulos IFI			
Paciente No.	en muestra aguda	en muestra de convalecencia	Municipio donde consultó
14	<1/64	1/512	Turbo
58	1/4.096	1/131.072	Turbo
60	1/8.192	1/131.072	Turbo
86	1/8.192	1/32.768	Turbo
94	<1/64	1/256	Apartadó
202	1/256	1/1.024	Necoclí



**Figura 6.** Frecuencia de infección para el grupo de las fiebres manchadas en personas con síndrome febril del Urabá Antioqueño (IFI)

el municipio de Necoclí y con la ausencia de acueducto. La exposición a ectoparásitos en los pacientes humanos se asoció con el municipio de Necoclí ( $p<0,001$ ), el inicio de signos clínicos en mayo y junio del 2008 ( $p<0,05$ ), la ocupación profesional ( $p<0,01$ ) y el mal manejo de basuras ( $p<0,01$ ) (figura 8).

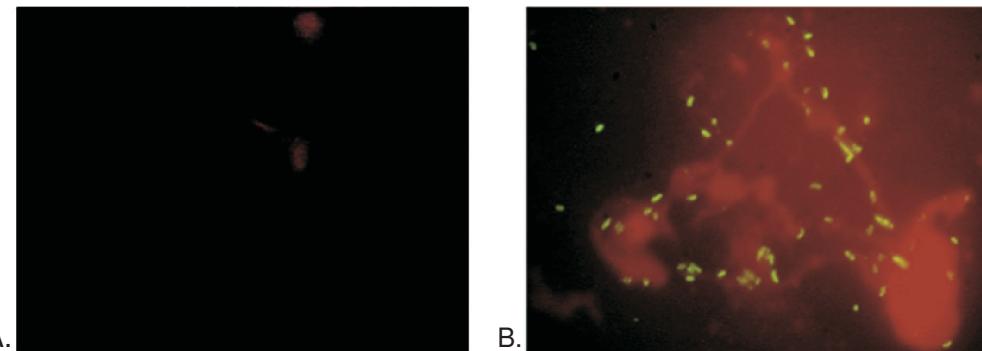
#### Discusión

En este estudio fue posible avanzar en el conocimiento de los huéspedes involucrados en el ciclo de las rickettsias en el noroeste de Colombia y también se obtuvo una estimación de la frecuencia de infección por estos agentes en la población humana, que complementa los resultados del estudio de Padmanabha, *et al.* (7).

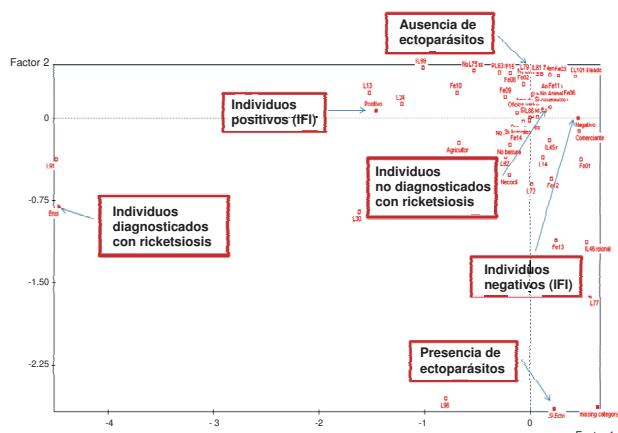
Entre los aportes de este trabajo cabe destacar la identificación de un potencial vector de la enfermedad, las garrapatas del género *Amblyomma*, de las cuales se obtuvo amplificación de los genes *gltA* y *OmpA* de *Rickettsia* spp. por PCR. Además, la secuenciación de los productos de PCR permitió un acercamiento a la identificación de las especies

**Cuadro 4.** Caracterización y distribución de las variables categóricas activas y suplementarias en humanos

Variables en humanos	n=220 (%)	Seroprevalencia n=53 (%)	Diagnóstico n=6 (%)
<b>Sexo</b>			
Hombre	58,18	58,49	83,3
Mujer	41,82	41,52	16,7
<b>Raza</b>			
Afroamericana	30,91	28,3	0
Mestiza	69,09	71,7	100
<b>Edad (años)</b>			
<21	36,11	30,77	60
21-40	38,43	40,38	0
>40	25,46	28,85	40
<b>Municipio de consulta</b>			
Apartadó	43,6	28,3	16,67
Turbo	36,82	33,96	66,66
Necoclí	19,55	37,74	16,67
<b>Acueducto</b>			
Sí	50,91	33,96	33,34
No	49,09	66,04	66,66
<b>Animales domésticos</b>			
Sí	64,09	73,58	100
No	35,91	26,42	0
<b>Presencia de roedores en vivienda</b>			
Sí	98,64	96,5	100
No	1,36	3,77	0
<b>Exposición a ectoparásitos</b>			
Sí	11,82	9,43	14,29
No	88,18	90,57	85,71
<b>Manejo de basura</b>			
Sí	65,45	56,6	33,34
No	34,55	43,4	66,66
<b>Diagnóstico de rickettsiosis</b>			
Sí	3,18	13,2	100
No	9,82	86,8	0
<b>Ocupación</b>			
Agricultor	8,18	13,21	50
Albañil	0,91	0	0
Ama de casa	24,55	26,42	16,66
Auxiliar de enfermería	2,73	1,89	0
Comerciante	2,73	0	0
Desempleado	1,36	0	0
Docente	0,91	0	0
Estudiante	24,09	20,75	33,33
Menor de edad	2,73	1,89	0
Militar	2,27	1,89	0
Oficios varios	25	32,08	0
Policía	0,91	1,89	0
Profesional	3,64	0	0
<b>Fecha de inicio de signos clínicos</b>			
Febrero de 2007	0,45	1,89	0
Julio de 2007	1,82	1,89	0
Agosto de 2007	1,82	5,66	0
Septiembre de 2007	4,55	1,89	16,66
Octubre de 2007	8,18	3,77	0
Noviembre de 2007	6,36	1,89	0
Diciembre de 2007	4,09	0	0
Enero de 2008	7,27	3,77	33,33
Febrero de 2008	9,55	11,32	16,66
Marzo de 2008	10	26,42	16,66
Abril de 2008	8,64	5,66	0
Mayo de 2008	15,91	13,21	0
Junio de 2008	4,55	3,77	0
Julio de 2008	13,64	18,87	16,66
Agosto de 2008	3,18	0	0



**Figura 7.** Ejemplos de inmunofluorescencia indirecta para el antígeno de *Rickettsia rickettsii* obtenidos con (A) suero control negativo y (B) suero de paciente positivo, a una dilución de 1/131.072



al. (30) quienes no encontraron ningún roedor positivo por PCR de ADN extraído de tejidos de las especies *Microtus arvalis*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* y *Apodemus arvicola*, en el sur de Alemania, aunque la serología mostró una prevalencia del 43 %.

Otro de los hallazgos sorpresivos en este estudio, fue la alta frecuencia de anticuerpos para *Rickettsia* spp. en *R. rattus* y *R. norvegicus*, 73,5 % y 59,1 %, respectivamente. Esto tiene, sin embargo, un precedente en otro estudio llevado a cabo en la región de Santa Cruz, Brasil, donde se encontró una reacción serológica del 81,3 % en *R. rattus* (23). En el mismo estudio no se encontró ningún resultado reactivo en los roedores silvestres *Nectomys squamipes* y *Oryzomys subfalus*, contrario a lo observado en nuestro caso, en el cual sí se presentó con mucha frecuencia IgG antirickettsias en *Z. cherriei* (16,3 %), *P. semispinosus* (16,7 %) y *H. anomalus* (66,6 %). Las diferentes especies de roedores silvestres capturadas en estos trabajos, podrían explicar la diferencia en los hallazgos.

En relación con este último punto, el análisis factorial de correspondencia múltiple que se realizó con las variables en los roedores, demostró una relación entre la presencia de infección detectada por PCR y la especie *Z. cherriei*, lo cual indica que esta especie se debe tener en cuenta para posteriores estudios donde el objetivo sea encontrar posibles reservorios de la enfermedad en Colombia. La relación que se demostró con la presencia de infección y la zona de captura (rural) y el sitio de captura (cultivo), se debe a que la mayoría de los *Z. cherriei* fueron capturados en esas condiciones particulares.

La variable activa, reacción de anticuerpos contra rickettsias, se relacionó de manera estrecha con la presencia de infección detectada por PCR; además, se encontraron asociaciones con los sitios de captura (casa y bodega), con la zona (urbana) y con la fecha (marzo del 2008). Todos las variables anteriores, a su vez, se relacionaron con la especie *R. rattus*, lo cual explica las asociaciones de la infección con el sitio y la zona de captura. Existen pocos reportes de los posibles vectores para rickettsias en este roedor, aunque previamente se sugirió que ácaros del género *Ornithonyssus* (*O. bacoti*) recolectados de *R. rattus* y *R. norvegicus* eran vectores de *Rickettsia* spp. en Egipto, pues resultaron positivos por PCR con cebadores específicos para rickettsias (31). En el presente estudio, la mayoría de ectoparásitos que

se recolectaron en *R. rattus* también fueron ácaros del género *Ornithonyssus* sp., pero a diferencia del estudio en Egipto, todos fueron negativos por PCR. Lo anterior podría indicar que esta especie no se comporta como vector para rickettsias en este hábitat particular, o que lo hace pero con una baja prevalencia de la infección.

La frecuencia de seropositivos en humanos encontrada en ese estudio (29,2 %) es similar a la encontrada (24%) en el estudio de Padmanabha, et al., publicado en el 2008. En un estudio similar llevado a cabo en el municipio de Villeta, Cundinamarca, se encontró una seroprevalencia de anticuerpos anti-*Rickettsia* de 40,3 %, pero no se encontró ninguna asociación entre la presencia de anticuerpos y otras variables analizadas, como ocupación, nivel de educación, material de construcción de la vivienda y convivencia con animales domésticos. Por el contrario, el presente estudio muestra una asociación de la infección por rickettsias con variables tales como consulta en el municipio de Necoclí, inicio de los síntomas en marzo de 2008 y ausencia de acueducto en las viviendas. Aunque las variables analizadas en ambos estudios son diferentes, la disparidad de los resultados podría también explicarse por variaciones metodológicas y diferencias en condiciones ecológicas y socioeconómicas en ambas zonas endémicas.

En otro estudio realizado en el departamento de Córdoba, en una región vecina y ecológicamente similar a la zona de Urabá, se demostró una seroprevalencia de hasta el 49 % por IFI en trabajadores del campo (32). Además, nuestro estudio permitió hacer una estimación de la frecuencia de rickettsiosis como causa de síndrome febril. Aunque esta estimación solo se pudo hacer en los 26 pacientes con muestras pareadas, el 23,1 % encontrado indica que *Rickettsia* spp. es una causa importante de este tipo de síndrome en los municipios estudiados. Tomados en su conjunto, estos hallazgos demuestran que la infección por rickettsias es un evento frecuente en varias zonas del país, cuyo impacto en la salud pública parece haber sido subestimado.

Un asunto que queda por definir es la identidad precisa de las rickettsias que han causado los brotes anteriores y los casos recientes demostrados en este estudio. En los casos fatales de los brotes en Antioquia (6,7) y Cundinamarca (33), los estudios post mórtem con inmunohistoquímica y PCR con cebadores específicos para agentes del

grupo de las fiebres manchadas, fueron positivos para *R. rickettsii*, lo cual está de acuerdo con la gravedad del cuadro clínico, ya que esta especie es reconocida como la más virulenta del género *Rickettsia*. En este estudio, el único indicio de que esa especie si está presente en la zona fueron los títulos de 1:131.072 alcanzados por dos de los pacientes sintomáticos residentes en el municipio de Turbo, en la zona donde se presentó un brote de rickettsiosis que dejó cuatro personas fallecidas en el 2008 (cuadro 3). Los títulos de este valor probablemente sean específicos de la especie utilizada en la sensibilización de las placas de IFI, en este caso, de *R. rickettsii* (M. Labruna, comunicación personal).

Sin embargo, en este estudio no se encontraron secuencias de *R. rickettsii* ni en garrapatas ni en roedores. Esto pudo deberse a que la especie vector de este agente en la zona de estudio, hasta ahora desconocida, no utiliza los roedores como huésped o a que su prevalencia en las garrapatas de esta región es baja y, por tal razón, no se detectó. Una explicación alternativa es que los resultados interpretados como indicativos de *R. rickettsii* en los estudios anteriores, en realidad, correspondían a infecciones por otra rickettsia del grupo de las fiebres manchadas, quizás el agente similar a *R. tamurae* encontrado en larvas de *Amblyomma* spp. en este estudio, el cual también podría ser el responsable de los seis casos de seroconversión detectados. *Rickettsia tamurae* se aisló originalmente de *Amblyomma testudinarium* en el Japón, en 1993 (34) y, recientemente, se asoció a enfermedad localizada sin síntomas generales, en un caso en el mismo país (35).

Otro hallazgo inesperado y de implicaciones desconocidas, fue la presencia de secuencias de una rickettsia del grupo de los tifus, cercana a *R. prowazekii*, en el hígado de siete roedores, tanto silvestres como sinantrópicos, capturados en Necoclí y Turbo. *Rickettsia prowazekii* es el agente causal del tifus epidémico transmitido por piojos y se considera la segunda especie más virulenta del género *Rickettsia*. En Suramérica, en los años recientes esta especie solo se ha diagnosticado en pacientes humanos en el Perú, especialmente en zonas de Calca-Cuzco (36). Más recientemente aún, se ha sugerido la participación de las garrapatas del género *Amblyomma* spp. como vectores de *R. prowazekii* en México (37).

Las secuencias del gen *gltA* de *R. prowazekii* disponibles en el GenBank son todas idénticas,

razón por la cual la pequeña diferencia encontrada (1,3 %) en estas secuencias probablemente indique que se trata de otra especie aún no catalogada. Sin embargo, es necesario estudiar secuencias de otros genes y, en lo posible, aislar esta rickettsia para establecer su identidad y estudiar sus propiedades biológicas. Tomados en su conjunto, estos hallazgos indican que en la zona de Urabá circulan varias especies del género *Rickettsia*, algunas de ellas con potencial patógeno y otras cuya virulencia está por estudiarse.

Finalmente, es bien sabido que el ciclo de vida de las rickettsias involucra factores ecológicos que no fueron incluidos dentro del presente estudio, como son la cobertura vegetal relacionada con la presencia de garrapatas y los factores climáticos. La presentación de tres brotes en los meses de febrero y marzo de 2006 a 2008, y la asociación estadísticamente significativa encontrada aquí entre infección por rickettsias y el inicio de los síntomas en marzo de 2008, claramente sugieren la importancia de los factores estacionales como determinantes de la transmisión a humanos. La complejidad de las interacciones entre agente, vector y reservorio, y de todos estos a su vez con el hombre, hacen que la comprensión integral de la ecoepidemiología de las rickettsiosis requiera de enfoques multidisciplinarios, con participación de ciencias como ecología, entomología, medicina, microbiología, epidemiología y ciencias sociales.

En el presente estudio hemos aportado datos importantes para el esclarecimiento de dicho asunto, especialmente en cuanto a la diversidad de los vertebrados, artrópodos y agentes que pueden estar involucrados en el problema de las rickettsiosis en el norte de Colombia. Estos resultados no son concluyentes pero aportan un punto de partida para continuar el estudio de estas enfermedades en una región en la cual han impactado gravemente la salud de la población humana.

### Agradecimientos

A Sergio Solari y Daisy Gómez, por su colaboración con la clasificación de los roedores silvestres (Grupo de Mastozoología, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia); a Sergio Bermúdez (Instituto Conmemorativo Gorgas, Panamá); a José Manuel Venzal (Universidad de la República Regional del Norte, Uruguay) y a Luis Paternina (Universidad de Sucre, Colombia), por su aporte en la clasificación de los vectores; a Luis Fernando Restrepo (profesor de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia), por su

asesoría en el análisis estadístico; a Carlos Muskus (PECET, Universidad de Antioquia), por su apoyo en la logística de este estudio; a Gustavo Valbuena (University of Texas Medical Branch, USA), Marcelo Labruna (Universidad de São Paulo, Brasil) y Marylin Hidalgo (Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia), por su asesoría en pruebas de diagnóstico y generosa donación de reactivos no comerciales para las mismas; y al Instituto Nacional de Salud de Colombia, por ayudarnos a implementar la prueba la inmunofluorescencia en nuestro laboratorio.

### Conflictode intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses para la publicación del presente manuscrito.

### Financiación

Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (proyecto 2387) y Estrategia de Sostenibilidad 2009-2010 del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia.

### Referencias

1. Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. *Rickettsia* phylogenomics: Unwinding the intricacies of obligate intracellular life. PLoS ONE. 2008;3:e2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002018>
2. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition. New York: Springer; 2005. p. 99.
3. Walker DH. The realities of biodefense vaccines against *Rickettsia*. *vaccine*. 2009;27:52-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.045>
4. Patiño L, Afanador A, Paul JH. A spotted fever in Tobia, Colombia. 1937. Biomédica. 2006;26:178-93.
5. Hidalgo M, Sanchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker DH, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group *Rickettsiae* in a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:378-80.
6. Acosta J, Díaz A, Urquijo L, Rey G, Sepúlveda C, Herrera D, et al. Brote de *Rickettsia rickettsii* en Necoclí, Antioquia, Colombia, 2006. *Inf Quinc Epidemiol Nac*. 2006;11:161-76.
7. Padmanabha HM, Valbuena G, Castañeda E, Galeano A, Puerta H, Cantillo C, et al. Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial and leptospiral exposure in Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009;9:483-90. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2008.0092>
8. Pacheco O, Giraldo R, Martínez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri I, et al. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac*. 2008;13:145-60.
9. Hidalgo M, Salguero E, de la Ossa A, Sánchez R, Vesga JF, Orejuela L, et al. Murine typhus in Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:321-2.
10. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ. Métodos para trampado y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. Atlanta: CDC; 1998.
11. Londoño AF, Díaz FJ, Agudelo-Flórez P, Levis S, Rodas JD. Genetic evidence of hantavirus infections in wild rodents from northwestern Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11:701-8. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2010.0129>
12. Emmons L, Feer F. Neotropical rainforest mammals. Second edition. Chicago and London: The University of Chicago Press; 1997. p. 184-245.
13. Voss R. An introduction to the neotropical muroid rodent genus *Zygodontomys*. New York: American Museum of Natural History; 1991. p. 59-62.
14. Weksler M. Phylogenetic relationships of *Oryzomys* rodents (Muroidea, Sigmodontinae): Separate and combined analyses of morphological and molecular data. New York: American Museum of Natural History; 2006. p. 3-82.
15. Anderson R. Preliminary review of the systematics and biogeography of the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 1999;23:613-27.
16. Patterson BD, Timm RM. Studies in neotropical mammalogy essays in honor of Philip Hershkovitz. *Fieldiana Zoology* No. 39. Illinois; Field Museum of Natural History; 1987. p 289-346.
17. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos. Proyecto "Las rickettsias como agentes etiológicos de entidades febiles no diagnosticadas en Colombia". Bogotá: INS; 2006. p. 4-27.
18. Kohls GM, Sonenshine DE, Clifford CM. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the Western hemisphere and descriptions of three new species. *Ann Entomol Soc Am*. 1965;58:331-64.
19. Wenzel RL, Tipton VJ. Ectoparasites of Panamá. Chicago: Field Museum of Natural History; 1966. p. 289-300.
20. Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *J Med Entomol*. 2008;45:1156-9. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[1156:CSOLSO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[1156:CSOLSO]2.0.CO;2)
21. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:4876-82. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
22. Swofford D. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods). Version 4.0b 10. ed. Sinauer; 2002.
23. Pena DC, Mafra CL, Calic SB, Labruna MB, Milagres BS, Walker DH, et al. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:243-4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02165.x>
24. Pinter A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from

- an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of Sao Paulo, Brazil. Cad Saude Publica. 2008;24:247-52. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008000200003>
25. **SAS Institute Inc.** The SAS system for Windows 9.0. V9 ed. Nueva California, USA: SAS Institute; 2002.
  26. **Decisia S.** SPAD. V56 ed. Levallois-Perret Cedex, Francia: 2003.
  27. **Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvao MA, et al.** 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 JTrop Med Hyg. 2004;71:93-7.
  28. **Silveira I, Pacheco RC, Szabo MP, Ramos HG, Labruna MB.** *Rickettsia parkeri* in Brazil. Emerg Infect Dis. 2007;13:1111-3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1307.061397>
  29. **Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>
  30. **Pluta S, Hartelb K, Oehmec R, Mackenstedt U, Kimmiga P.** Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. Ticks Tick Borne Dis. 2010;1:145-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.04.001>,
  31. **Reeves W, Loftis A, Szumlas D, Abbassy M, Helmy I, Hanafi H, et al.** Rickettsial pathogens in the tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti* (Acar: Macronyssidae) from Egyptian rats (*Rattus* spp.). Exp Appl Acarol. 2007;41:101-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-006-9040-3>
  32. **Miranda A, Flores S, Mátar S.** Alta seroprevalencia de rickettsiosis en trabajadores del campo en el municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2002;7:65-80.
  33. **Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernández J, Parra E, et al.** Rocky Mountain spotted fever, Colombia. Emerg Infect Dis. 2007;13:1058-60. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1307.060537>
  34. **Fournier PE, Takada N, Fujita H, Raoult D.** *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1673-5. <http://dx.doi.org/10.1099/ijst.0.64134-0>
  35. **Imaoka K, Kaneko S, Tabara K, Kusatake K, Morita E.** The first human case of *Rickettsia tamurae* infection in Japan. Case Rep Dermatol. 2011;3:68-73. <http://dx.doi.org/10.1159/000326941>
  36. **Labruna MB.** Ecology of rickettsia in South America. Ann N Y Acad Sci. 2009;1166:156-66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>
  37. **Medina-Sánchez A, Bouyer DH, Alcantara-Rodríguez V, Mafra C, Zavala-Castro J, Whitworth T, et al.** Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico. Ann N Y Acad Sci. 2005;1063:327-32. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1355.052>