

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO VETERINARIO DE LABORATORIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

Título. Aislamiento, caracterización genética y análisis filogenético
de *Rickettsia massiliae*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Autor. Gabriel L. Cicuttin

Director. Mariana Kienast

Codirector. Edgardo Marcos

2016

Índice

A – Introducción.....	3
B – Planteamiento del problema.....	8
C – Desarrollo.....	10
C1 – Metodología.....	10
C2 – Resultados.....	13
D – Conclusiones.....	27
E – Bibliografía.....	30

A - Introducción

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG), entre ellas las rickettsiosis, presentan una rápida expansión en el mundo. La incidencia se ha incrementado de manera desproporcionada en relación con otras enfermedades emergentes. Las razones de este aumento incluyen cambios en la prevalencia y distribución de los reservorios animales y vectores garrapatas, así como el movimiento de los seres humanos dentro de las zonas donde animales hospedadores y garrapatas son abundantes. El aumento de la población humana y los cambios demográficos han traído cambios dramáticos en la distribución y composición de los hábitats naturales, la modificación del uso del suelo para vivir, la agricultura, o la recreación. Estos cambios significan que la gente y los animales interactúan en muchas más interfaces, creando nuevas oportunidades para la transmisión de patógenos zoonóticos, incluidas las ETG (Institute of Medicine, 2011; Munderloh y Kurtti, 2010; Vu Hai y col., 2014).

Las ETG son el resultado de la interacción de la biología de la garrapata (hospedador/es, clima y especies), la exposición a la garrapata (p. ej., lugar de residencia, ocupación y actividades recreativas), y la biología humana (p. ej., edad y género) (Randolph, 2004). Los animales domésticos pueden actuar como nuevos reservorios y ser hospedadores-puente en la transferencia de las enfermedades emergentes a los seres humanos (Institute of Medicine, 2011; Munderloh y Kurtti, 2010).

El género *Rickettsia* (Flia. Rickettsiaceae, orden Rickettsiales, subdivisión Alpha-Proteobacterias) está conformado por bacterias intracelulares obligadas, con forma de cocobacilos (0,3 a 1 μm) gram-negativos (débiles) que se colorean con la tinción de Gimenez, Giemsa y naranja de acridina, y no crecen en medios de cultivo habituales, necesitando para su aislamiento animales de laboratorio, huevos embrionados, líneas celulares de mamíferos como Vero, HEL, L-929 o líneas celulares de artrópodos (Oteo y col., 2014; Venzal y Nava, 2011). Son transmitidas por artrópodos vectores (garrapatas, ácaros, pulgas o piojos). En el hospedador vertebrado, invaden las células endoteliales de vasos sanguíneos pequeños, produciendo lesiones con un incremento en la permeabilidad vascular y edema (Venzal y Nava, 2011).

En los últimos 20 años se han descrito aproximadamente 60 nuevas especies de rickettsias (Venzal y Nava, 2011). El género se clasifica en cuatro grupos filogenéticos: i) grupo de las fiebres manchadas (GFM), transmitido principalmente por garrapatas ixódidas (garrapatas duras); ii) grupo de transición (que incluye a *Rickettsia felis* y *Rickettsia akari*, transmitidas por pulgas y ácaros respectivamente); iii) grupo de las fiebres tíficas –GFT- (*Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowaseckii*), transmitidos por

insectos (pulgas y piojos respectivamente); y iv) un grupo ancestral que incluye a *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*, transmitido principalmente por garrapatas (Cicuttin, 2014c; Socolovschi y col., 2009; Venzal y Nava, 2011).

El GFM puede presentar ciclos enzoóticos o epizoóticos con la participación de vertebrados, pero las garrapatas son generalmente el principal reservorio y vector de estos patógenos en la naturaleza, dada la habilidad de las rickettsias para sobrevivir en las mismas y transmitirse en forma transestadial y transovárica. En los últimos tiempos se ha producido un incremento en la ocurrencia de rickettsiosis en áreas urbanas, reconociéndose nuevos patógenos humanos (*Rickettsia massiliae*), y además patógenos relacionados con áreas silvestres comenzaron a detectarse en ambientes urbanos, tal como *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia parkeri*, principalmente debido a que vertebrados reservorios y ectoparásitos vectores comenzaron a ser frecuentes en las ciudades, especialmente en áreas urbanas protegidas (Cicuttin, 2014c).

En Argentina se han detectado varias especies de rickettsias del GFM, de las cuales tres (*R. rickettsii*, *R. parkeri* y *R. massiliae*) produjeron casos humanos confirmados en distintas regiones del país (Venzal y Nava, 2011).

Rickettsia massiliae

Fue aislada por primera vez en 1990 de una garrapata *Rhipicephalus turanicus* en Marsella (Francia) –cepa Mtu1- (Beati y Raoult, 1993). Posteriormente fue aislada en España (Bar29), Francia (Mtu5), Grecia (GS) y EEUU (AZT80) (Beeler y col., 2011; Renvoisé y col., 2012). Es un bacilo corto (0,3-0,4 a 0,6-1 µm) gram-negativo intracelular obligado, observable con la tinción de Giménez y crece en cultivo celular de líneas tales como L929 y Vero. Filogenéticamente se agrupa con *R. rhipicephali* y *R. aeschlimannii*, conformando un grupo de rickettsias con resistencia a la rifampicina. Distintos genotipos han sido detectados en distintas especies de garrapatas *Rhipicephalus* incluyendo genotipo Mtu5 detectado en *Rhipicephalus senegalensis* y genotipo Mtu1 en *Rhipicephalus sulcatus*, *Rhipicephalus lunulatus* y *Rhipicephalus mushamae* en Africa Central, y genotipo Bar29 en *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus* de Europa (Beeler y col., 2011).

Los vectores de *R. massiliae* son especies de garrapatas del género *Rhipicephalus* (incluyendo la garrapata común del perro *Rh. sanguineus*), con distintos niveles de infección en garrapatas, de un 2,5 a 18 % en España, 2,5 % en Grecia, 5-6 % en África, 25 % en Israel, más del 25 % en Estados Unidos hasta un 5-20 % en Argentina. Las diferentes prevalencias encontradas se relacionan con las distintas poblaciones y especies de garrapatas estudiadas, los hospedadores desde donde fueron

recolectadas y los métodos diagnósticos utilizados (Cicuttin y col., 2014a y 2014b). *Rh. sanguineus* (Acari: Ixodidae) es un complejo de especies con distribución mundial e importancia sanitaria animal y humana, dado que transmite numerosos agentes patógenos (Bowman, 2011; Otranto y col., 2009; Parola y col., 2013). En América, se han identificado al menos dos linajes de *Rh. sanguineus*: tropical y templado. El linaje tropical tiene distribución en áreas tropicales del norte de Argentina hasta el sur de EEUU y se encuentra relacionado con *Rh. sanguineus* presentes en África. Por otra parte, el linaje templado está asociado a climas templados y fríos del resto de Argentina, Chile, Uruguay y Norteamérica, y se encuentra relacionado con *Rh. sanguineus* de Europa. La posible diferencia en la competencia vectorial de los distintos linajes necesita ser más estudiada para determinar el papel potencial de las garrapatas de cada linaje para transmitir distintos patógenos (Moraes Filho y col. 2011 y 2015; Nava y col., 2012).

Hasta la actualidad se han confirmado pocos casos humanos por este patógeno. El primer caso humano confirmado fue notificado en 2006, siendo confirmado desde un aislamiento obtenido de la sangre de un paciente con rickettsiosis de la década del 80 procedente de Sicilia (Italia). En 2010 se publicó un caso procedente de Buenos Aires -sin más detalles sobre la ubicación del paciente, desconociéndose si el paciente era de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires o de provincia de Buenos Aires- (ocurrido originalmente en 2005), diagnosticado en España por PCR. Posteriormente en 2008, se diagnosticó un tercer paciente con signos similares en Europa. Complementariamente, distintos estudios serológicos realizados en Europa revelan una alta seropositividad a *R. massiliae*, y además, la característica de este patógeno de resistencia a rifampicina sugiere también su implicación en numerosos casos clínicos ocurridos en España, atribuidos originalmente a *R. conorii* (agente sensible a rifampicina) (Cicuttin, 2014c). En un estudio reciente, se detectó seropositividad a *Rickettsia* del GFM en el 28,3 % de 99 sueros obtenidos de pacientes de barrios con necesidades básicas insatisfechas (NBI) de un centro de salud de CABA (Cicuttin y col., 2015a). La sintomatología clínica incluye fiebre, dolor de cabeza, lesión necrótica en el sitio de la picadura de la garrapata (*tache noir*), erupción purpúrica máculopapular (en extremidades, espalda, palmas de las manos y plantas de los pies) y disminución aguda bilateral de la visión (con coriorretinitis). El diagnóstico se puede realizar por inmunofluorescencia indirecta (IgM e IgG) con antígeno específico, utilizándose sueros pareados para buscar seroconversión y otra técnica de elección es la PCR especialmente a partir de biopsia de la lesión necrótica producida por la garrapata. El tratamiento de elección es la doxiciclina (Cicuttin, 2014c).

El papel de los caninos domésticos como hospedadores reservorios es desconocido, especialmente por la corta duración de su rickettsemia. Estudios realizados en España demostraron seropositividad en perros (8,6-25 %), así como garrapatas infectadas recolectadas de los mismos (18 %), estos hallazgos pueden ser relacionados con casos humanos en áreas endémicas (Beeler y col., 2011). En CABA se detectó el 79,6 % y 19,7 % de caninos seropositivos a un título 1/40 y 1/320 respectivamente (Cicuttin y col., 2004), sin embargo, distintos estudios realizados por PCR en caninos dieron negativos (Cicuttin y col., 2014a y 2014b). Por otra parte, *R. massiliae* en perros podría producir un cuadro clínico con signología. En EEUU se encontró un foco con perros con signología compatible (similar a otras rickettsiosis caninas causadas por *R. rickettsii* y *R. conorii*), seropositividad y garrapatas positivas (Beeler y col., 2011). En América, *R. massiliae* fue hallada por primera vez en el 2004 en CABA en garrapatas *Rh. sanguineus* obtenidas de perros de un barrio carenciado de la ciudad (Cicuttin y col., 2004). Al año siguiente se detectó también en CABA el caso humano mencionado en párrafos anteriores. En años posteriores también fue detectada por PCR en garrapatas *Rh. sanguineus* en Arizona (EEUU), California (EEUU), Virginia (EEUU), Bahía Blanca (Argentina) y Mendoza (Argentina) (Beeler y col., 2011; Cicuttin, 2014c; Fornadel y col., 2013). Sin embargo, hasta el momento no ha sido aislada en nuestro país (Cicuttin, 2014c).

La circulación de este patógeno en áreas urbanas, más aún en barrios con NBI, donde el ciclo de transmisión vector-hombre se facilita por un contacto estrecho con animales en un entorno de malas condiciones de salubridad, es de gran importancia para la salud pública. La garrapata común del perro *Rh. sanguineus* está perfectamente adaptada a condiciones de vida urbana. La elevada infestación presente en los perros hace muy frecuente su hallazgo en el interior de las viviendas (tengan animales o no) y posibilita la ocurrencia de picaduras, principalmente en niños (Cicuttin y col., 2015b; Cicuttin, 2014c), que posiblemente pasen desapercibidas por el sistema de salud, dada la poca información existente sobre estos patógenos a nivel médico, así como la escasa disponibilidad diagnóstica.

Hipótesis

Las garrapatas *Rh. sanguineus* colectadas de caninos domésticos de CABA están infectadas con *R. massiliae*.

La cepa circulante de *R. massiliae* en garrapatas *Rh. sanguineus* colectadas de caninos domésticos de CABA está relacionada filogenéticamente con cepas aisladas en Europa.

Objetivo general

Aislar, caracterizar genéticamente y analizar filogenéticamente aislamientos de *Rickettsia massiliae*, presente en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* colectadas de caninos domésticos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en 2014.

Objetivos específicos

- 1) Detectar por PCR el género *Rickettsia* en garrapatas *Rh. sanguineus*.
- 2) Aislar las rickettsias presentes en las garrapatas positivas mediante cultivo celular.
- 3) Caracterizar los aislamientos mediante seis fragmentos genéticos (espacio intergénico 23S-5S rRNA, *ompA*, *ompB*, *gltA*, *htrA* y *sca1*).
- 4) Analizar filogenéticamente las secuencias de ADN obtenidas.

B – Planteamiento del problema

Las enfermedades transmitidas por garrapatas forman parte de algunas de las enfermedades infecciosas transmitidas por artrópodos con más rápida expansión en el mundo pero, sin embargo, existen importantes lagunas en la comprensión y conocimiento de las mismas (Institute of Medicine, 2011; Munderloh y Kurtti, 2010). Las garrapatas se han reconocido como parásitos humanos desde hace miles de años, pero el potencial para transmitir enfermedades infecciosas se demostró recién a finales del siglo 19, cuando Smith y Kilbourne probaron que *Boophilus annulatus* transmitía el protozoo *Babesia bigemina*. A principios del siglo 20, las garrapatas fueron implicadas como vectores de enfermedades bacterianas a los humanos: se describió la fiebre recurrente causada por *Borrelia duttonii* y transmitida por *Ornithodoros moubata* y Ricketts demostró que la garrapata *Dermacentor andersoni* estaba involucrada en la transmisión de *R. rickettsii*, el agente de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. En 1910, los primeros casos de Fiebre Maculosa del Mediterráneo fueron reportados en Túnez y en 1930 se estableció el papel de *Rh. sanguineus* en la transmisión de esta enfermedad. En 1929, Francis describe la epidemiología de la tularemia y el papel de los artrópodos hematófagos, incluyendo las garrapatas. Después de la Segunda Guerra Mundial, una serie de enfermedades virales, bacterianas y protozoarias se describieron en los animales y en los seres humanos. En la década de 1980, la borreliosis de Lyme debido a *Borrelia burgdorferi* fue descrita, y actualmente es considerada la enfermedad por vectores más importantes de Europa y Estados Unidos. Más recientemente, una serie de nuevas rickettsiosis transmitidas por garrapatas se han registrado en todo el mundo, y las bacterias del género *Ehrlichia* también han sido reconocidas como patógenos humanos transmitidos por garrapatas (Parola y Raoult, 2001). Es así que con el desarrollo de la biología molecular, nuevas especies, cepas o variantes genéticas de estos microorganismos están siendo detectadas en las garrapatas en todo el mundo, y la lista de posibles agentes patógenos transmitidos por garrapatas sigue aumentando. Algunos de estos agentes, como *Rickettsia slovaca*, *R. parkeri* y *R. massiliae*, fueron identificados en garrapatas, años o décadas antes de que se asociaran con enfermedades humanas. Pero a pesar de la enorme contribución de la biología molecular para el descubrimiento de nuevas especies o cepas, los datos genéticos deben ser interpretados con cautela (Dantas Torres y col., 2012).

En las últimas décadas se ha producido un incremento en la ocurrencia de casos humanos de rickettsiosis en áreas urbanas, con la aparición de nuevos patógenos (como *R. felis* y *R. massiliae*), de patógenos tradicionalmente relacionados con áreas

silvestres (tal como *R. rickettsii* y *R. parkeri*) -debido a que vertebrados reservorios y ectoparásitos vectores comenzaron a ser frecuentes en las ciudades-, y aparición de nuevos ciclos de transmisión en ambientes urbanos (como *R. typhi* y la pulga *Ctenocephalides felis*) (Cicuttin, 2014c). Todo esto implica que la epidemiología de estos patógenos es mucho más compleja que lo pensado originalmente (Comer y col., 2001; Renvoisé y col., 2012). Los animales de compañía (principalmente perros y gatos) y sinantrópicos (como ratas –*Rattus norvegicus* y *R. rattus*- y ratones -*Mus musculus*-) pueden servir como hospedadores amplificadores de estos agentes y fundamentalmente transportar y dispersar los ectoparásitos vectores (Comer y col., 2001).

En las enfermedades infecciosas es de suma importancia primero la detección del patógeno y luego la identificación genética de la cepa mediante técnicas moleculares, lo que permite develar, entre otras cosas, mecanismos de patogenicidad, virulencia y resistencia a fármacos antimicrobianos. La creciente facilidad con que se puede obtener información genética, cuantificar las diferencias y compartir datos ha llevado a la identificación más precisa de cepas bacterianas. Este enfoque genético difiere de la clásica comparación de fenotipos (por métodos químicos, coloraciones, etc) permitiendo profundizar en las diferencias entre cepas bacterianas. Los estudios a nivel molecular han hecho grandes contribuciones a la comprensión de la epidemiología, clínica, diagnóstico, tratamiento e inmunoprofilaxis de las enfermedades infecciosas. A nivel epidemiológico, los análisis filogenéticos permiten la asociación entre un mismo patógeno aislado en áreas geográficas diferentes o en situaciones temporalmente distintas. Es así como el estudio de cepas bacterianas a nivel molecular ha modificado drásticamente la visión sobre la relación patógeno-hospedador (Relman y Falkow, 2006).

La confirmación de la circulación de *R. massiliae* en las zonas urbanas de Argentina, tanto en garrapatas *Rh. sanguineus*, así como la seropositividad halladas en distintos estudios en perros y en humanos, resaltan la importancia sanitaria de este patógeno para la región (Cicuttin y col., 2015a). El aislamiento, la caracterización genética y el análisis filogenético de la cepa de *R. massiliae* presente en garrapatas *Rh. sanguineus* de CABA permitirá mejorar el conocimiento del patógeno circulante, su relación filogenética con otras cepas a nivel mundial, así como lograr una mejora diagnóstica futura mediante la producción de antígeno específico para ensayos serológicos.

C - Desarrollo

C1 - Metodología

Muestreo. Se colectaron garrapatas de caninos domésticos de la Villa N° 20 de CABA, entre Septiembre y Octubre de 2014. Las muestras fueron obtenidas en las actividades de atención de zoonosis llevadas a cabo por la Residencia de Veterinaria en Salud Pública en dicho barrio. Las garrapatas se conservaron vivas hasta su procesamiento dentro de las 24 horas de colectadas.

Procesamiento de las garrapatas. Las garrapatas fueron identificadas siguiendo las claves taxonómicas descritas (Boero, 1957), a continuación se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 2 minutos, sumergiéndose posteriormente en etanol al 70 % durante 5 minutos, luego se lavaron en agua destilada 3 veces y finalmente se secaron con papel absorbente. Cada ejemplar fue individualmente seccionado a la mitad longitudinalmente con hoja de bisturí estéril. Las garrapatas se agruparon en 4-5 mitades de ejemplares por canino muestreado, una mitad se utilizó para diagnóstico molecular y la otra mitad para el posterior aislamiento en cultivo celular. Todas las muestras se conservaron a -75°C en un microtubo de 1,5 ml libre de nucleasas.

Diagnóstico molecular desde garrapatas. El ADN fue extraído de cada grupo de garrapatas mediante el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Alemania), según indicaciones del fabricante. Como control negativo de extracción se utilizó agua libre de nucleasas.

Para la detección de *Rickettsia* spp. se utilizó una PCR simple para amplificar un fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr (Jado y col., 2006). Como control positivo se utilizó *Rickettsia conorii* (plásmido) y como control negativo agua libre de nucleasas.

Aislamiento. De los grupos de garrapatas positivos por PCR se utilizó el grupo correspondiente previamente separado para aislamiento. El cultivo se realizó mediante la técnica de *shell vial* para aislamiento de rickettsias ya descrita (Ammerman y col. 2009; Labruna y col., 2004 y 2007) con algunas modificaciones. Resumidamente, cada pool de garrapatas fue triturado en 700 µl de caldo cerebro-corazón. El homogenato resultante se inoculó en tres *shell vials* conteniendo una monocapa de células Vero.

Después de la inoculación, el *shell vial* fue centrifugado durante 1 hora a 700 G a 21°C. La monocapa se lavó con medio esencial mínimo suplementado con 5 % de suero fetal bovino con antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina) y se incubó a 35°C en atmósfera de 5 % de CO₂. Luego de 3 días, el medio se reemplazó por uno sin antibióticos. El medio aspirado (que contenía restos celulares) se examinó para la presencia de rickettsias por inmunofluorescencia directa (IFD) y PCR. La IFD se realizó utilizando el control positivo (IgG humana anti-*Rickettsia* GFM) provisto en el Rickettsia IFA IgG kit (Focus Diagnostics, Langenhagen-Hannover, Germany). Cuando el resultado fue positivo por IFD y PCR, las células se cosecharon e inocularon dentro de botellas de 25 cm² que contenían una monocapa de células Vero no infectadas. Se consideró a un aislamiento como establecido cuando al menos se hicieron 3 pasajes por botellas de 25 cm², con un nivel de infección mayor al 90 % (determinada por IFD).

Caracterización genética. La caracterización molecular de los aislamientos se realizó por PCR para fragmentos de distintos genes (Tabla 1). Estos genes fueron caracterizados en la mayoría de las especies de rickettsias y son importantes blancos para taxonomía (Monje y col., 2014).

Tabla 1. Caracterización molecular

Frag-mento	Cebador	Secuencia (5´-3´)	Tamaño (pb)	Referencia
Espacio intergénico 23S-5S ARNr	RCK/23-5-F	GATAGGTCRGRTGTGGAAGCAC	388	(Jado y col., 2006)
	RCK/23-5-R	TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC		
<i>ompA</i>	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532	(Pacheco y col., 2011)
	Rr190.602n	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT		
<i>ompB</i>	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	813	(Roux y Raoult, 2000)
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA		
<i>gltA</i>	CS-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	788	(Pacheco y col., 2011)
	CS-1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
<i>htrA</i>	17k-5	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	497	(Pacheco y col., 2011)
	17k-3	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC		

<i>sca1</i>	F1MAX	AAGAGGTYTRTGGATGCGT	443	(Pacheco y col., 2011)
	RMAX	GAYAATATATTATTYTCCTTC		

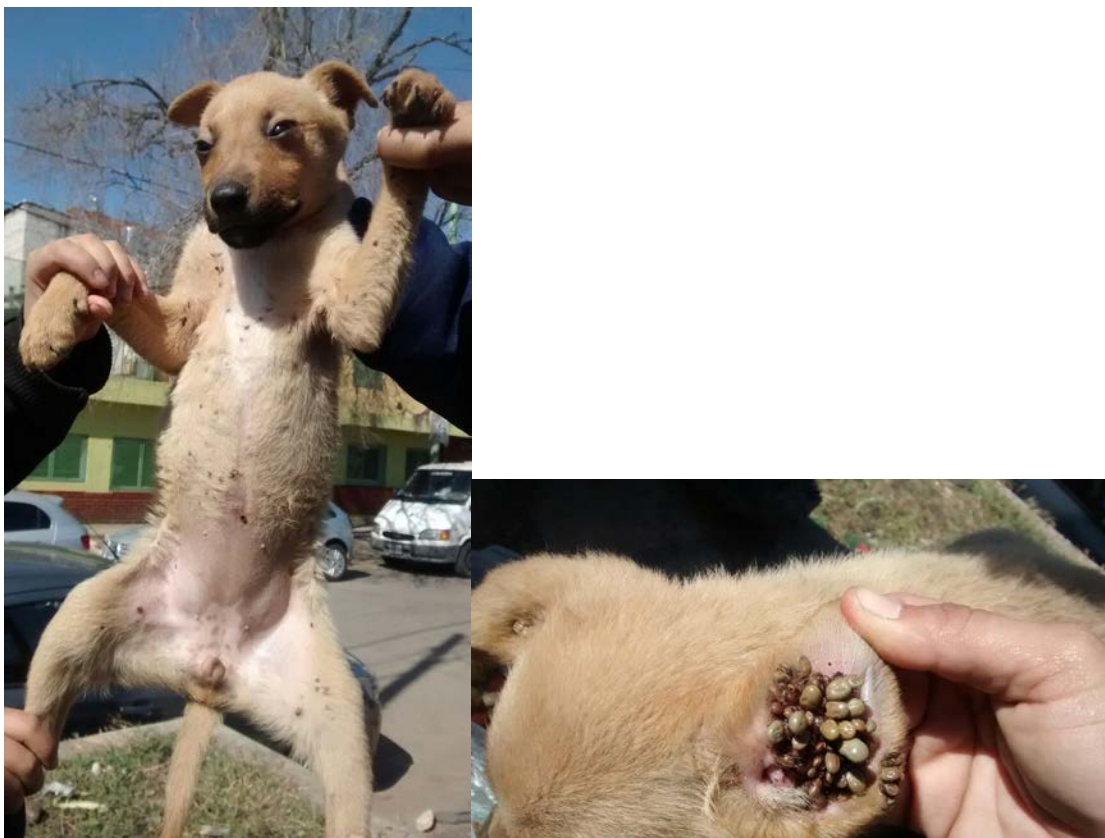
Secuenciación. Los productos amplificados fueron purificados con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) y secuenciados en un secuenciador 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, EEUU). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank y comparadas con secuencias disponibles en esa base de datos mediante la utilización del software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Análisis filogenético. El análisis de alineamiento múltiple se realizó con el algoritmo CLUSTAL y la construcción del árbol filogenético con el software MEGA versión 5. Un filograma fue construido para cada gen analizado, usando diversos parámetros y métodos. Los valores de confianza para cada rama de los árboles resultantes fueron determinados mediante 1000 replicaciones de remuestreo (*bootstrap*).

C2 - Resultados

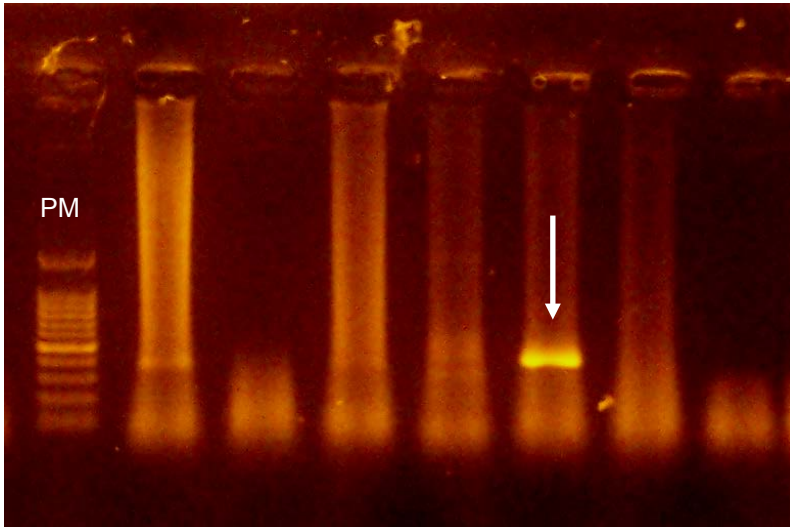
Objetivo 1) Detectar por PCR el género *Rickettsia* en garrapatas *Rh. sanguineus*

Se colectaron 49 garrapatas de 10 caninos de Villa N° 20 (CABA), las cuales fueron identificadas como especímenes adultos de *Rh. sanguineus* (Fotografía 1).



Fotografía 1. Infestación de caninos con garrapatas en Villa N° 20 (Imágenes gentileza Cielo Linares)

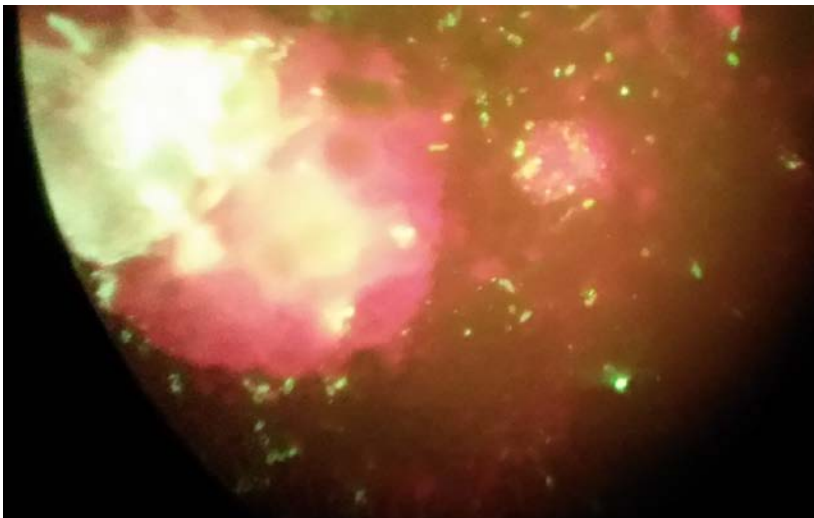
Se conformaron 10 grupos de 4-5 ejemplares para su análisis mediante PCR. Un grupo de 5 garrapatas fue positivo para la PCR para un fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr del género *Rickettsia*, resultando en un nivel mínimo de infección del 2,0 % (Fotografía 2). El producto de la PCR fue secuenciado y exhibió 100 % de identidad con *R. massiliae*.

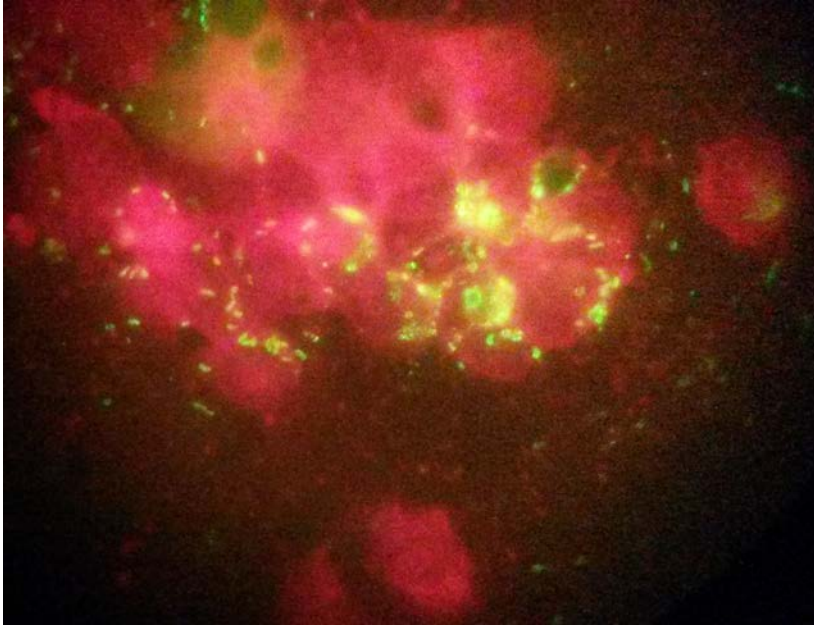


Fotografía 2. Gel de agarosa de la PCR fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr del género *Rickettsia*; PM: marcador de peso molecular (100-1500 pb); flecha: muestra positiva

Objetivo 2) Aislar las rickettsias presentes en las garrapatas positivas mediante cultivo celular

R. massiliae presente en el grupo de garrapatas positivas a la PCR fue cultivada exitosamente en células Vero, confirmándose su crecimiento mediante IFD (Fotografía 3) y PCR.



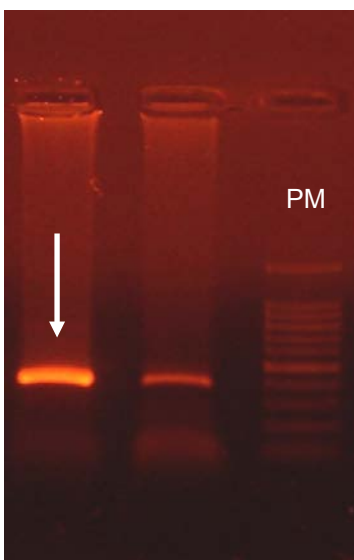


Fotografía 3. IFD del cultivo obtenido. Bacilos verde brillante = rickettsias. Fondo color rojo = células Vero.

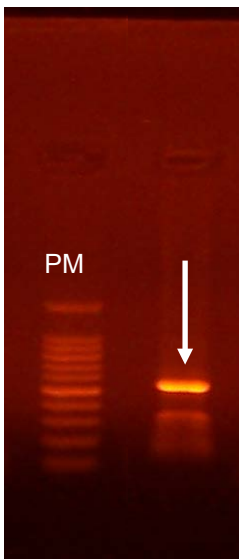
El aislamiento fue positivo en cada uno de los tres pasajes, considerándose la cepa establecida en cultivo. La cepa fue denominada CABA.

Objetivo 3) Caracterizar los aislamientos mediante seis fragmentos genéticos (espacio intergénico 23S-5S rRNA, *ompA*, *ompB*, *gltA*, *htrA* y *sca1*).

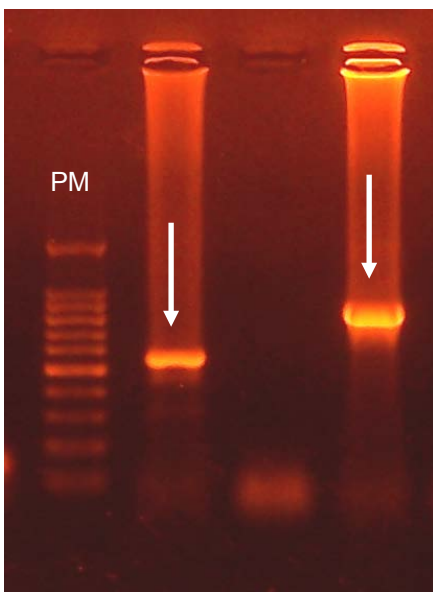
Se extrajo ADN de las células infectadas en el tercer pasaje y se realizó las PCRs para cada uno de los 6 fragmentos genéticos, resultando todos positivos (Fotografía 4 a 7).



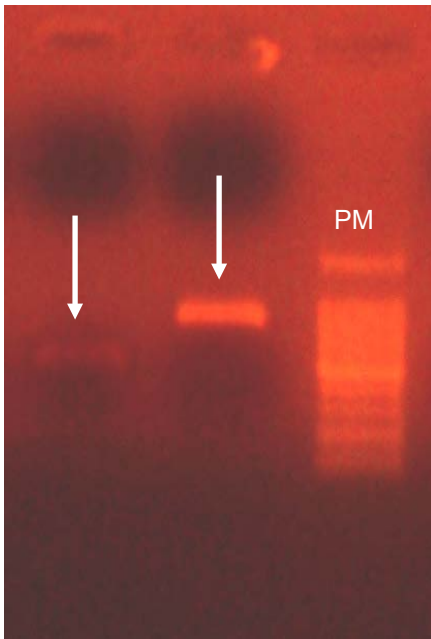
Fotografía 4. Gel de agarosa de la PCR fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr; PM: marcador de peso molecular (100-1500 pb); flecha: cepa CABA



Fotografía 5. Gel de agarosa de la PCR fragmento del gen *ompA*; PM: marcador de peso molecular (100-1500 pb); flecha: cepa CABA



Fotografía 6. Gel de agarosa de las PCRs de fragmentos de los genes *htrA* y *ompB*; PM: marcador de peso molecular (100-1500 pb); flechas: cepa CABA (izquierda: *htrA*, derecha: *ompB*)



Fotografía 7. Gel de agarosa de las PCRs de fragmentos de los genes *sca1* y *gltA* y; PM: marcador de peso molecular (100-1500 pb); flechas: cepa CABA (izquierda: *sca1*, derecha: *gltA*)

Los productos de las PCRs fueron secuenciados y la comparación con otras cepas de *R. massiliae* se muestra en la Tabla 2. Además, las secuencias obtenidas tuvieron 100 % de identidad respecto a hallazgos previos en Argentina: CABA (espacio intergénico 23S-5S -KC525896- y *ompA* -KC525893 y JX101680-), 2004 y 2014, y Bahía Blanca (espacio intergénico 23S-5S -KF826281- y *gltA* -KF826286-), 2014.

Tabla 2. Identidad entre *Rickettsia massiliae* cepa CABA y otros aislamientos mundiales

Fragmento génico	Nº de acceso GenBank	Cepa	% Similitud (pb)
23S-5S	CP003319	AZT80	100 (341/341)
	AY125014	Bar29	100 (341/341)
	CP000683	Mtu5	99,4 (340/342)
	KT340610	Mtu1	99,4 (312/314)
<i>ompA</i>	CP003319	AZT80	100 (491/491)
	U43792	Bar29	100 (491/491)
	CP000683	Mtu5	99,6 (489/491)
	U43799	Mtu1	99,6 (489/491)

<i>ompB</i>	CP003319	AZT80	99,3 (811/817)
	AF123710	Bar29	100 (817/817)
	CP000683	Mtu5	99,3 (811/817)
	AF123714	Mtu1	99,3 (811/817)
<i>gltA</i>	CP003319	AZT80	100 (788/788)
	U59720	Bar29	100 (788/788)
	CP000683	Mtu5	99,9 (787/788)
	U59719	Mtu1	99,9 (787/788)
<i>htrA</i>	CP003319	AZT80	100 (498/498)
	n/d	Bar 29	n/d
	CP000683	Mtu5	99,2 (494/498)
	n/d	Mtu1	n/d
<i>sca1</i>	CP003319	AZT80	100 (488/488)
	AY502118	Bar29	99,2 (484/488)
	CP000683	Mtu5	99,2 (484/488)
	AY355364	Mtu1	99,2 (484/488)

Cepas: AZT80: Arizona (EEUU), 2006; Bar29: Barcelona (España), 1996; Mtu5: Camargue (Francia), 1995; Mtu1 (cepa de referencia): Marsella (Francia), 1993; n/d: no disponible.

Las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en la base de datos del GenBank con los siguientes números de acceso: KT032118 (espacio intergencio 23S-5S), KT032121 (*ompA*), KT032122 (*ompB*), KT032119 (*gltA*), KT032120 (*htrA*) and KT032117 (*sca1*).

Objetivo 4) Analizar filogenéticamente las secuencias de ADN obtenidas.

Los árboles fueron realizados con distintas cepas o hallazgos de *R. massiliae* a nivel mundial, siendo variable la información disponible a nivel genético, por consiguiente cada árbol tiene una comparación con distintas secuencias génicas, dado que sólo se utilizaron las secuencias con 100 % de cobertura con el fragmento estudiado. Para cada fragmento genético secuenciado se realizó un alineamiento múltiple mediante el

algoritmo CLUSTAL y la construcción del árbol filogenético fue hecha con el software MEGA versión 5 usando el método *maximum-likelihood* y los parámetros del modelo de Tamura-Nei y el mejor modelo de sustitución (*best fitting substitution model* GTR (G+I). Los valores de confianza para cada rama de los árboles resultantes fueron determinados mediante 1.000 replicaciones de remuestreo (*bootstrap*) y los *gaps* fueron excluidos para las comparaciones.

Los árboles filogenéticos se muestran en las Figuras 1 a 6. La información detallada en cada árbol fue la disponible en GenBank para cada secuencia utilizada: número de acceso de GenBank, nombre (de la cepa o de la secuencia), hospedador y ciudad (país). Se utilizó *R. parkeri* cepa Portsmouth (CP003341) como grupo externo (*outgroup*).

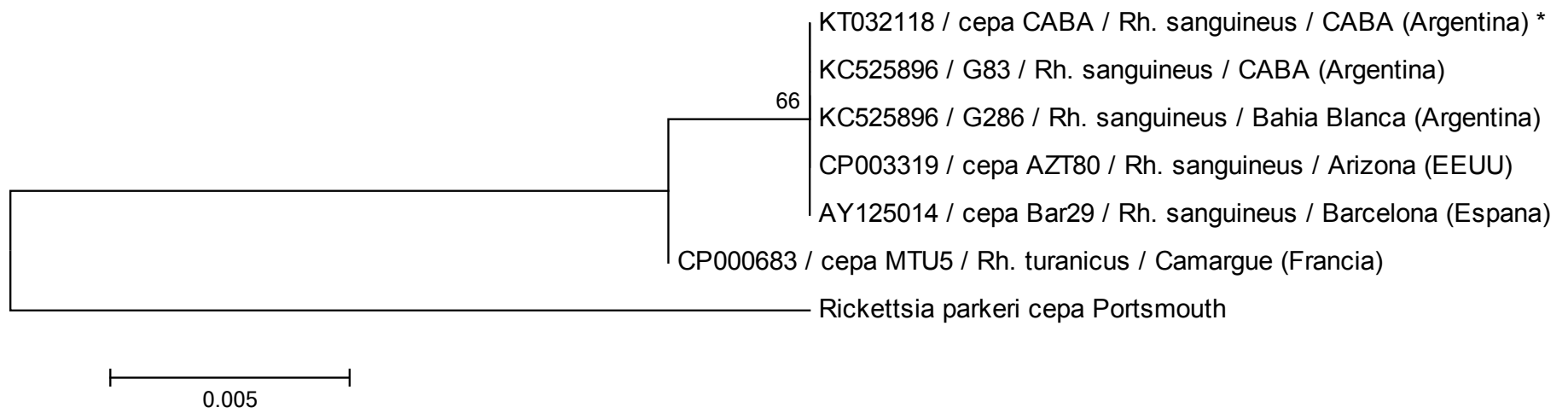


Figura 1. Árbol filogenético del fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr

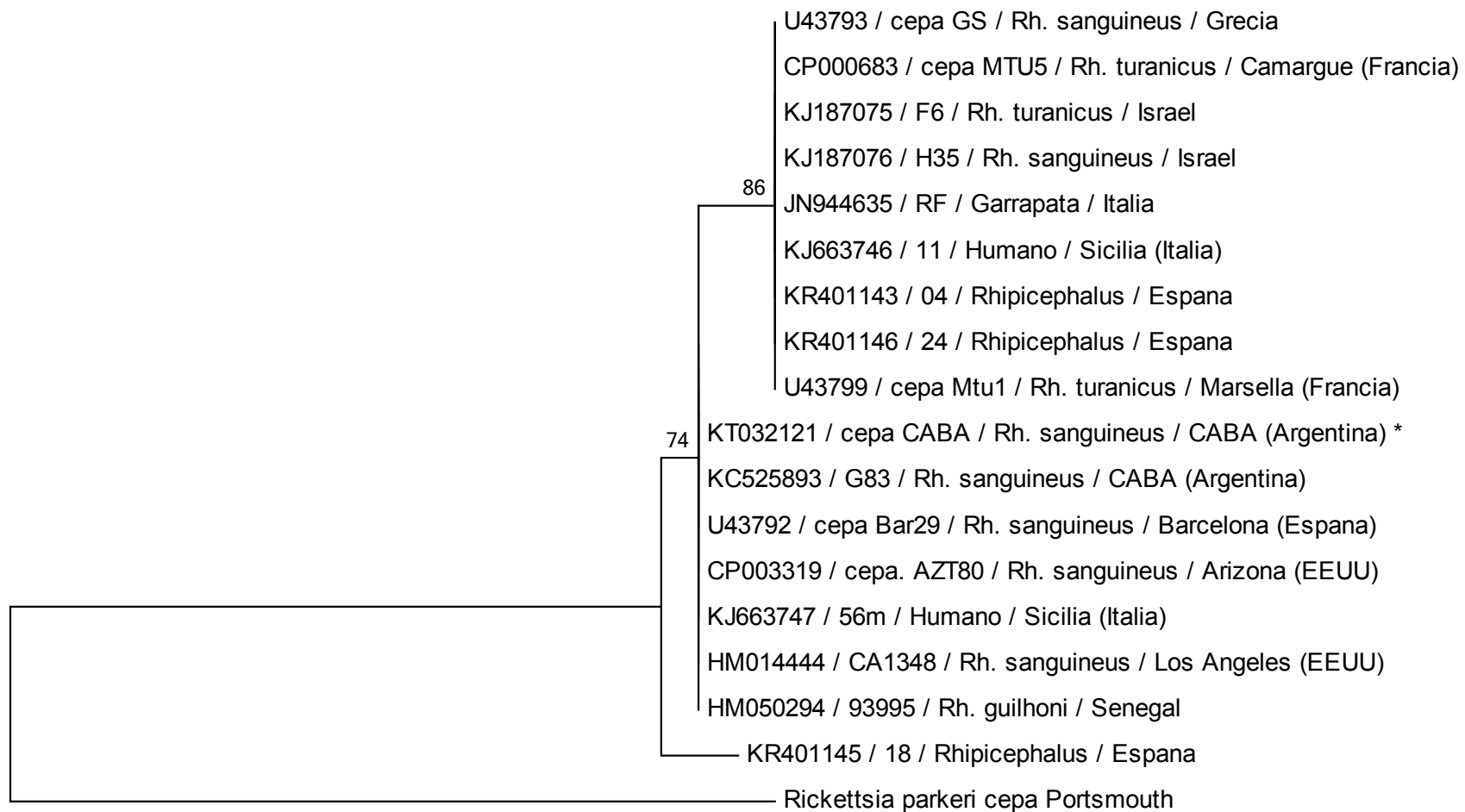


Figura 2. Árbol filogenético del fragmento del gen *ompA*

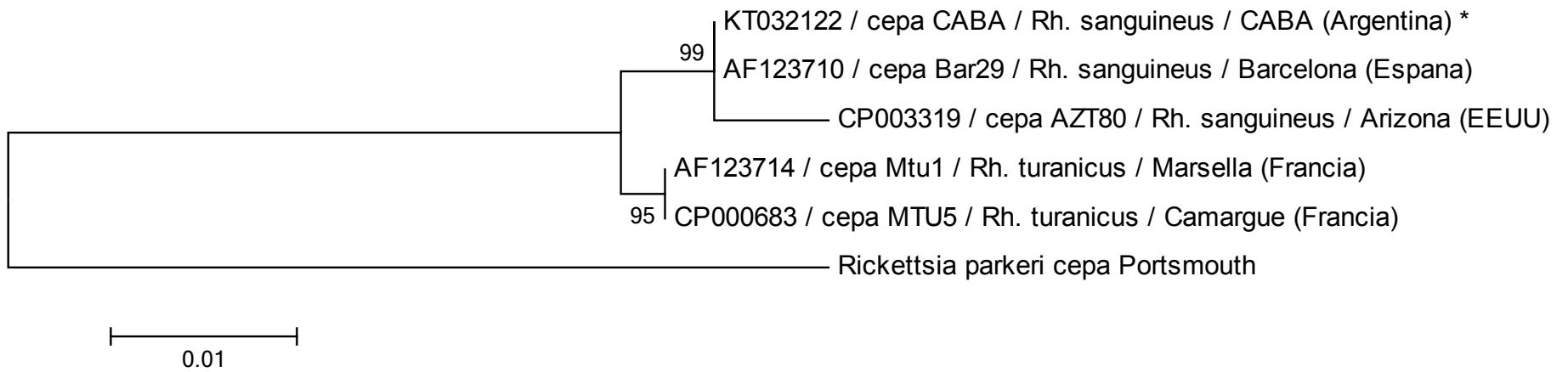


Figura 3. Árbol filogenético del fragmento del gen *ompB*

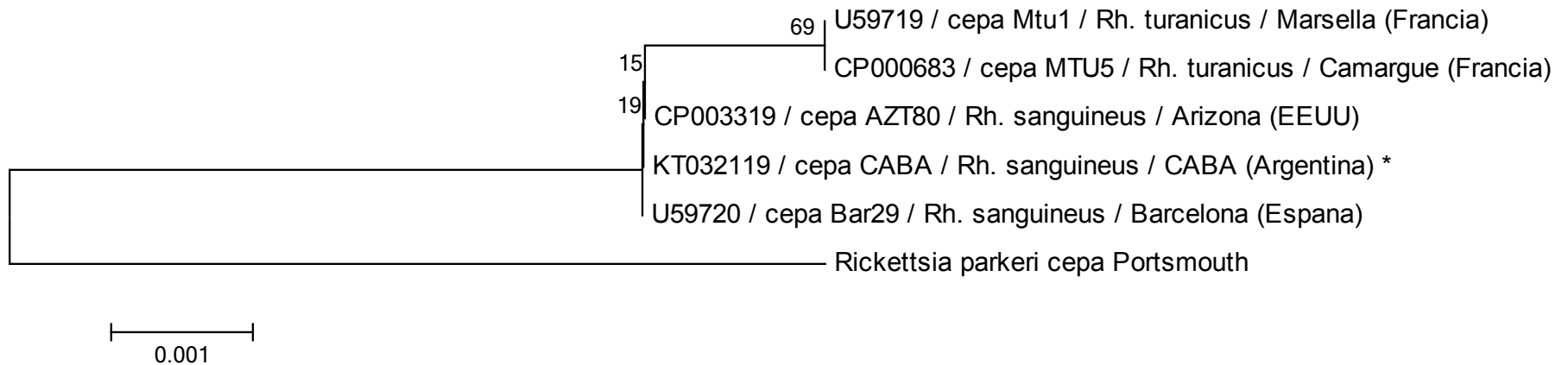


Figura 4. Árbol filogenético del fragmento del gen *gltA*

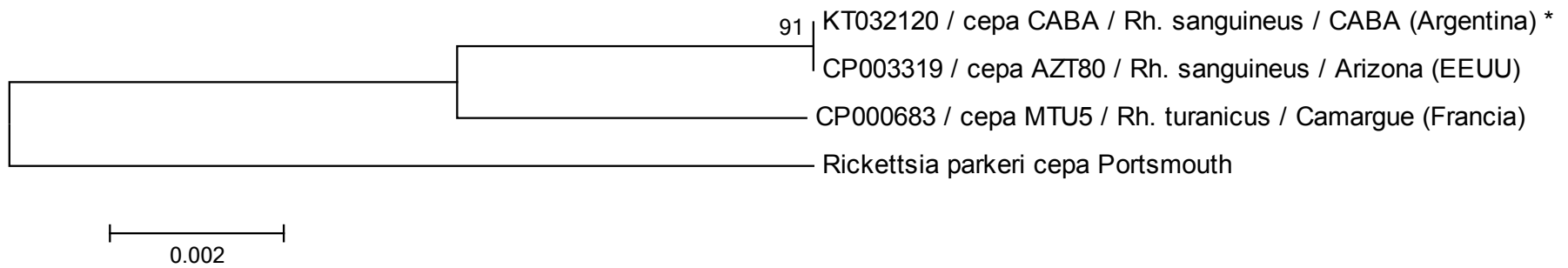


Figura 5. Árbol filogenético del fragmento del gen *htrA*

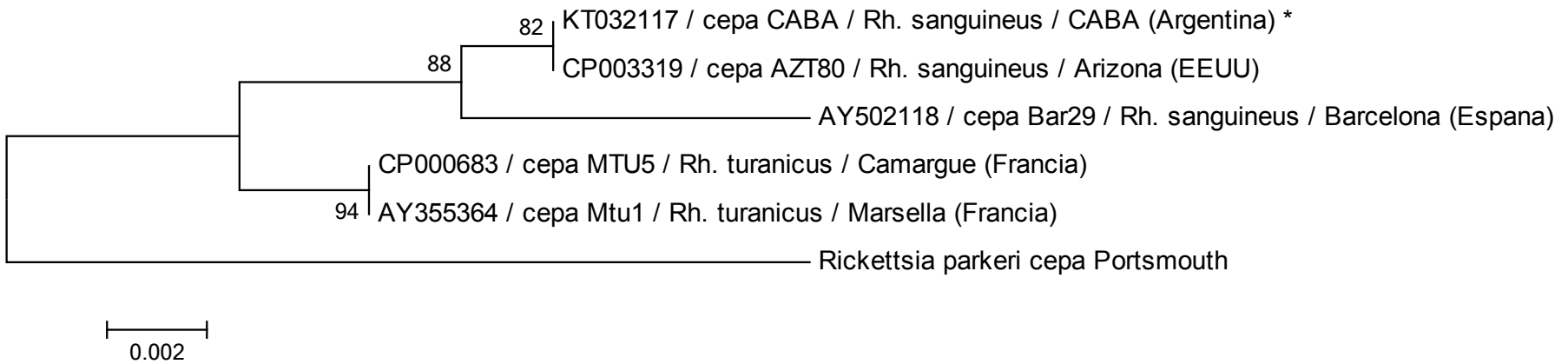


Figura 6. Árbol filogenético del fragmento del gen *sca1*

Se construyó un árbol filogenético del total de 3423 nucleótidos alineados de los fragmentos del espacio intergénico 23S-5S, *ompA*, *ompB*, *gltA*, *htrA* y *sca1*. Los fragmentos fueron concatenados y sujetos a análisis mediante el modelo *maximum-likelihood* utilizando los mismos parámetros que para los árboles anteriores (Figura 7). Se utilizaron para comparar cepas de distintas especies de rickettsias del mundo que se encuentra la información del genoma completo, así como dos cepas de *R. massiliae* (AZZT80 y MTU5). La lista de especies, sus vectores, rol patógeno y área de difusión se presentan resumidamente en la tabla 3. Se utilizó *R. australis* como grupo externo (*outgroup*).

Tabla 3. Especies de *Rickettsia* utilizadas en la construcción del árbol filogenético.

Especie	Garrapatas vectores potenciales o confirmados	Enfermedad	Región
<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma variegatum</i> , <i>A. hebraeum</i> , <i>A. compressum</i> , <i>A. lepidum</i> , <i>Rhipicephalus annulatus</i> , <i>Rh. evertsi</i> , <i>Rh. decoloratus</i> , <i>Rh. sanguineus</i> , <i>Rh. geigy</i> , <i>Hyalomma impeltatum</i>	Fiebre africana transmitida por garrapata	África subsahariana América del Norte y Central (por la introducción de <i>A. variegatum</i>)
<i>R. australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> , <i>I. tasmani</i> , <i>I. cornuatus</i>	Tifus por la garrapata de Queensland	Australia
<i>R. conorii</i> subsp <i>conorii</i>	<i>Rh. sanguineus</i> , <i>Rh. evertsi</i> , <i>Rh. simus</i> , <i>Rh. mushamae</i> , <i>Haemaphysalis punctaleachi</i> , <i>H. leachi</i>	Fiebre manchada del Mediterráneo	Europa África del norte África subsahariana
<i>R. heilongjiangensis</i>	<i>H. concinna</i> , <i>H. japonica douglasi</i> , <i>H. flava</i> , <i>Dermacentor silvarum</i>	Fiebre manchada del oriente lejano	Asia
<i>R. japonica</i>	<i>H. flava</i> , <i>H. hystricis</i> ,	Fiebre manchada	Asia

	<i>H. longicornis</i> , <i>H. cornigera</i> , <i>H. formosensis</i> , <i>I. ovatus</i> , <i>D. taiwanensis</i>	japonesa	
<i>R. montanensis</i>	<i>D. andersoni</i>	¿Fiebre manchada?	América del Norte
<i>R. parkeri</i>	<i>A. maculatum</i> , <i>A. americanum</i> , <i>A. triste</i> , <i>A. tigrinum</i> , <i>D. variabilis</i>	Fiebre manchada	América
<i>R. philipii</i>	<i>D. occidentalis</i>	Enfermedad febril	América del norte y central
<i>R. raoultii</i>	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>I. ricinus</i>	SENLAT (antiguamente denominado TIBOLA/DEBONE L)	Europa
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Rh. sanguineus</i> , <i>D. andersoni</i> , <i>D. occidentalis</i> , <i>D. variabilis</i>	Aún no relacionada con enfermedad humana	América
<i>R. rickettsii</i>	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>D. occidentalis</i> , <i>D. nitens</i> , <i>Rh. sanguineus</i> , complejo <i>A. cajennense</i> , <i>A. americanum</i> , <i>A. imitator</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>H. leporispalustris</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocallosas	América
<i>R. slovaca</i>	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	SENLAT (antiguamente denominado TIBOLA/DEBONE L)	Europa Norte de África
<i>Candidatus R. amblyommii</i>	Numerosas especies del género <i>Amblyomma</i>	¿Fiebre manchada?	América

Adaptado de Parola y col. (2013).

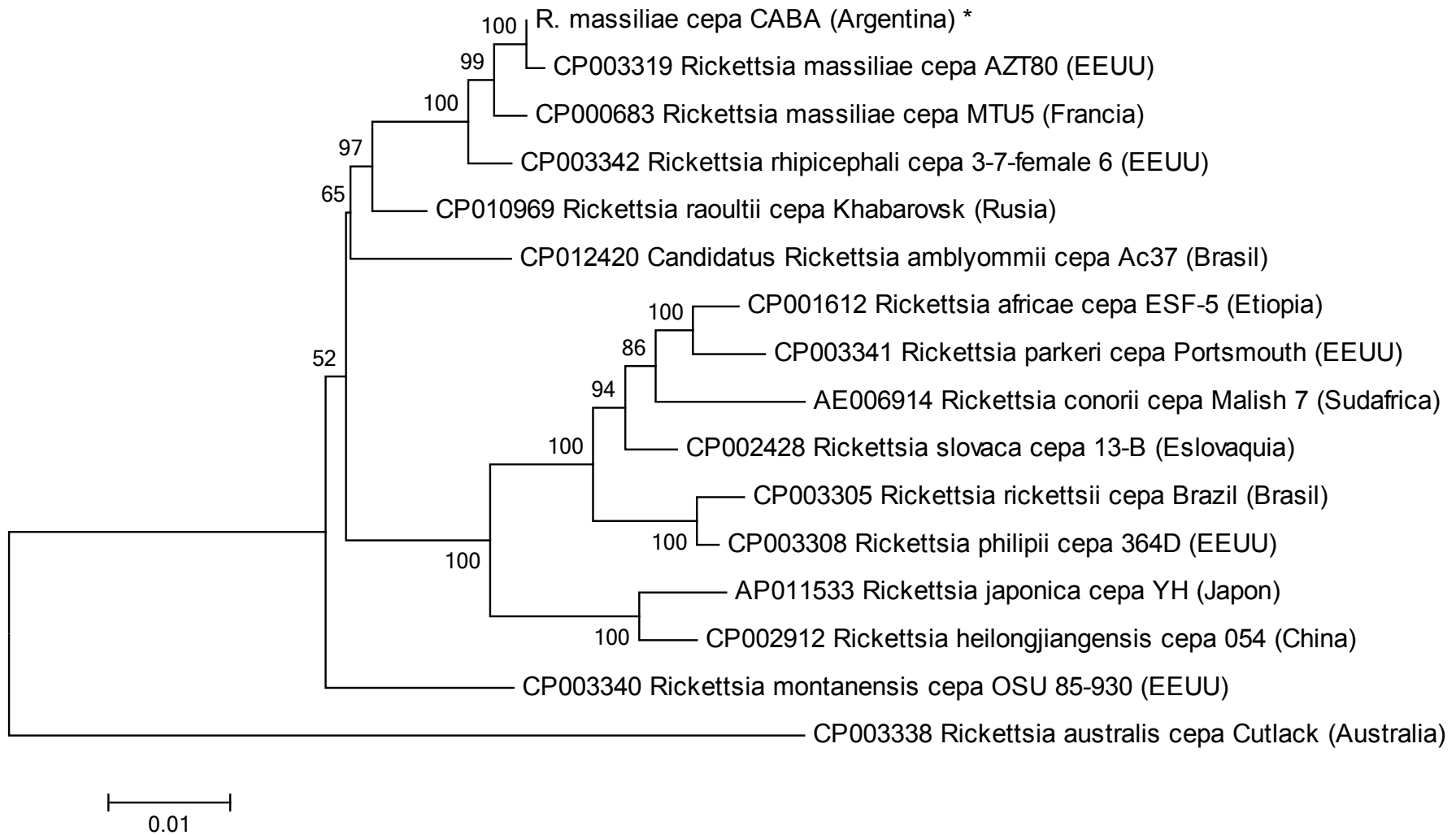


Figura 7. Árbol filogenético con todos los fragmentos genéticos concatenados

D – Conclusiones

Según nuestro conocimiento, este es el primer aislamiento de *R. massiliae* en Argentina y el segundo en las Américas. Además, es la segunda especie de rickettsia aislada en nuestro país.

R. massiliae ha sido detectada en garrapatas del género *Rhipicephalus* con diversos niveles de infección, en nuestro país fue detectada en 3,2 % al 20,0 % de garrapatas *Rh. sanguineus* de CABA y 12,0 % en Bahía Blanca (Cicuttin, 2014c; Cicuttin y col., 2015b). El nivel de infección detectado en este estudio (2,0 %) es similar a estudios previos, pero de suma importancia si consideramos que las garrapatas positivas fueron colectadas de 1/10 perros muestreados (10 %). Las diferencias entre los estudios previos posiblemente se encuentran relacionadas con la población de garrapatas estudiadas y los métodos diagnósticos utilizados. Además, el nivel de infección puede variar cuando las garrapatas se encuentran ingurgitadas, dado que pueden infectarse con microorganismos circulantes en la sangre del hospedero (Estrada Peña y col., 2013).

Diferentes genotipos de *R. massiliae* fueron detectados en distintas especies de *Rhipicephalus*, tales como Mtu5 detectada en *Rh. senegalensis* y Mtu1 en *Rh. sulcatus*, *Rh. lunulatus* y *Rh. mshamae* en África Central; Bar29 en *Rh. sanguineus* y *Rh. turanicus* de Europa; GS en *Rh. sanguineus* de Grecia; y AZT80 en *Rh. sanguineus* de EEUU (Beeler y col., 2011; Renvoisé y col., 2012). La cepa CABA es similar genéticamente a los hallazgos anteriores en Argentina (en CABA y Bahía Blanca), presenta sólo 4 nucleótidos de diferencia con respecto a la cepa Bar29 aislada en España (considerando 5 fragmentos génicos, dado que no se encuentran disponibles secuencias del gen *htrA* de Bar29) y sólo 6 nucleótidos de diferencia con respecto a la cepa AZT80 aislada en EEUU (considerando los 6 fragmentos génicos). A su vez, se debe tener en cuenta que el aislamiento obtenido, al ser a partir de un grupo de garrapatas (y no una garrapata individual) tiene la posibilidad de estar compuesto por distintas *R. massiliae* provenientes de más de una garrapata (si bien esto no se observó en las distintas secuencias obtenidas).

En los árboles filogenéticos de *R. massiliae* se observan agrupamientos similares entre los distintos fragmentos génicos analizados. Para el caso del fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr, por un lado se agrupan *R. massiliae* halladas/aisladas de *Rh. sanguineus* de América y España, y por el otro la cepa MTU5 aislada de *Rh. turanicus* de Francia (Figura 1). En el fragmento del gen *ompA* es donde se contó con la mayor cantidad de secuencias para construir el árbol filogenético, observándose un agrupamiento similar al anterior, destacándose

hallazgos en un caso humano de Italia y en *Rh. guilhoni* de Senegal que agrupan junto a la cepa CABA, (Figura 2). En los árboles de los fragmentos siguientes (*ompB*, *gltA*, *htrA* y *sca1*) se observa un patrón similar donde se agrupan cepas *R. massiliae* aisladas de *Rh. sanguineus* de América (CABA y AZT80) y España (Bar29) y por el otro las cepas Mtu1/MTU5 aisladas de *Rh. turanicus* de Francia (Figuras 3 a 6). En la Figura 7 se observa los distintos agrupamientos que presentan las rickettsias del GFM, principalmente por un lado el grupo formado entre otros por patógenos humanos reconocidos hace tiempo (como *R. africae*, *R. parkeri*, *R. conorii* y *R. rickettsii*) y otro grupo formado por *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. raoultii* y *Candidatus R. amblyommii*, formado por patógenos recientemente reconocidos y otros sospechados. Respecto a la relación entre las distintas cepas de *R. massiliae* y los vectores, se puede observar los hallazgos en distintas especies del género *Rhipicephalus* en distintas partes del mundo y, en general, la cercanía filogenética entre *R. massiliae* halladas en las mismas especies de vectores. La denominada tradicionalmente garrapata marrón común del perro (*Rh. sanguineus*) es una especie ampliamente estudiada de gran importancia sanitaria y económica. Sin embargo, a 210 años de su primera descripción, su estatus taxonómico no está resuelto, dado que el tipo original de la especie está perdido, su primera descripción (realizada por Latrielle en 1806) carece de muchos detalles importantes y no existe consenso en cuanto a la variabilidad morfológica dentro de la especie (Nava y col., 2015). Como se mencionaba en la introducción, hallazgos recientes (genéticos y de entrecruzamientos) sugieren que está conformada por distintas especies (Moraes Filho y col., 2011 y 2015; Nava y col., 2012 y 2015). Basados en los caracteres morfológicos, distintos autores a lo largo del tiempo han denominado como *Rh. sanguineus* a la mayoría de las garrapatas encontradas en perros con un aspecto similar, encontrándose en esta situación confusa especies como *Rh. camicasi*, *Rh. ghilhoni*, *Rh. sulcatus* y *Rh. turanicus*, entre otras, con lo cual es necesario redefinir todo este complejo de especies (Nava y col., 2015). Por ello, las distintas especies de *Rhipicephalus* donde se encontró *R. massiliae*, deben tomarse con cautela, especialmente en las regiones donde parecería haber solapamiento de especies, como en Europa y norte de África. Respecto a la situación en Argentina, distintos estudios han determinado la existencia de dos linajes: tropical (norte de Argentina, sin detección de *R. massiliae*) y templado (resto del país, donde se detectó *R. massiliae*) (Nava y col., 2012). En este sentido, *R. massiliae* en América sólo fue detectado en EEUU y Argentina, donde predomina el linaje templado de *Rh. sanguineus*, mientras que nunca fue detectado en países como Brasil, Colombia, México, entre otros, donde predomina el linaje tropical de *Rh. sanguineus* (Cicuttin, 2014c).

En CABA, *Rh. sanguineus* es la garrapata tradicionalmente asociada a caninos, con una elevada infestación especialmente en zonas de bajo nivel socioeconómico (Cicuttin, 2014c; Cicuttin y col., 2011). Numerosos estudios demostraron que la prevalencia es mayor entre los animales que vagabundean, quienes por lo general no tienen tratamiento contra ectoparásitos (Cicuttin, 2008 y 2014c). Es importante considerar que si bien el parasitismo de *Rh. sanguineus* en hospedadores que no sean perros es bastante inusual, está asociado principalmente a la presencia de perros y entornos muy infestados, condiciones que se dan habitualmente en barrios carenciados. En efecto, los altos niveles de infestación ambiental podrían aumentar el riesgo de exposición humana a *Rh. sanguineus* y por lo tanto el riesgo de adquirir patógenos transmitidos por garrapatas (Alvarez y col., 2014; Cicuttin, 2014c).

En conclusión, la importancia para la salud pública de *R. massiliae* en áreas urbanas del país está revelada por la descripción en Buenos Aires de un caso humano (García García y col., 2010), la detección en *Rh. sanguineus* en áreas urbanas como CABA, Bahía Blanca y Mendoza (Cicuttin, 2014c), la ocurrencia de picaduras de garrapatas en humanos en CABA y Bahía Blanca (Cicuttin y col., 2011) y la seropositividad detectada en humanos en barrios carenciados de CABA (Cicuttin y col., 2015a). Es así como este aislamiento es de importancia central para mejorar el conocimiento de la circulación de este patógeno y su relación filogenética con otros aislamientos mundiales. A futuro, podría permitir la producción de antígenos específicos para diagnóstico serológico de esta patología en nuestro país.

E - Bibliografía (no está corregido el formato)

- Alvarez G, Rosales C, Sepulveda, R. Rocky Mountain Spotted Fever, A Reemerging Disease in Arizona and Sonora- Case Study. *J Case Rep Stud.* 2014; 1(3): 12–14.
- Ammerman N, Beier Sexton M, Azad A. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Curr Protoc Microbiol.* 2009; Unit-3A.5: 1–27.
- Beati L, Raoult D. *Rickettsia massiliae* sp. nov., a New Spotted Fever Group Rickettsia. *Int J Syst Bacteriol.* 1993; 43(4): 839–840.
- Beeler E, Abramowicz KF, Zambrano ML, Sturgeon MM, Khalaf N, Hu R, Dasch G, Eremeeva ME. A focus of dogs and *Rickettsia massiliae*-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(2): 244–249.
- Boero J. Las garrapatas de la República Argentina (Acarina – Ixodoidea). Buenos Aires, Editorial Universidad de Buenos Aires, 1957, p. 113.
- Bowman D. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*. *Top Companion Anim Med.* 2011; 26(4): 173–177.
- Cicuttin GL, Rodríguez Vargas M, Jado I, Anda P. Primera detección de *Rickettsia massiliae* en la Ciudad de Buenos Aires. *Rev Arg de Zoonosis.* 2004; 1(1): 8–10.
- Cicuttin G. Presencia de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* en caninos de un barrio con necesidades básicas insatisfechas de la Ciudad de Buenos Aires. *Rev Arg de Zoonosis.* 2008; V(2): 56–61.
- Cicuttin G., Brambati D, Rodríguez Eugui J, González Lebrero C, De Salvo N, Vidal P, Gury Dohmen F. Garrapatas duras (Familia Ixodidae) en caninos domésticos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y del municipio de Bahía Blanca (Argentina). 2do Encuentro Nacional sobre Enfermedades Olvidadas y XIV Simposio Internacional sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores, 2011, p. 45, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Cicuttin GL, Brambati DF, Rodríguez Eugui JI, González Lebrero C, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE, Jado I, Anda P. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks Tick Borne Dis.* 2014a; 5: 484–488.
- Cicuttin GL, Vidal P, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Rev Chilena Infectol.* 2014b; 31(5): 563–568.

- Cicuttin GL. Rickettsiosis urbanas: *Rickettsia massiliae*. En: Basualdo Farjat J, Enría D, Martino P, Rosenzvit M, Seijo A (editores) Temas de Zoonosis VI. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, 2014c, p. 281-286.
- Cicuttin GL, Degiuseppe JI, Mamianetti A, Corin MV, Linares MC, De Salvo MN, Gury Dohmen FE. Serological evidence of *Rickettsia* and *Coxiella burnetii* in humans of Buenos Aires, Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015a; 43: 57–60.
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Siccardi FM, Gramajo L, Gury Dohmen FE. Caninos domésticos con elevada infestación por garrapatas y patógenos bacterianos asociados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Rev Arg de Zoonosis y Enf Inf Emerg*. 2015b; X(1): 13–16.
- Comer J, Paddock CD, Childs JE. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2001; 1(2): 91–118.
- Dantas Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks Tick Borne Dis: a One Health perspective. *Trends Parasitol*. 2012; 28(10): 437–446.
- Estrada Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens--methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3:29.
- Fornadel CM, Smith JD, Zawada SE, Arias JR, Norris DE. Detection of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* from the Eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013; 13(1): 67–69.
- García García JC, Portillo A, Núñez MJ, Santibáñez S, Castro B, Oteo JA. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82(4): 691–692.
- Institute of Medicine (IOM). Critical Needs and Gaps in Understanding Prevention, Amelioration, and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The short-term and long-term outcomes. Washington, The National Academies Press, 2011, pp. 560.
- Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez Alonso MI, Sousa R, García Pérez AL, Rodríguez Vargas M, Lobo B, Anda P. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(12): 4572–4576.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(1): 90–98.
- Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MJ. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(3): 869–873.

- Monje LD, Nava S, Antoniazzi LR, Colombo VC, Beldomenico PM. In vitro isolation and infection intensity of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* ticks from the Paraná River Delta region, Argentina. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5(6): 924–927.
- Moraes Filho J, Marcili A., Nieri Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop*. 2011; 117(1): 51–55.
- Moraes Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. (2015). Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Plos One*. 2015; 10(9): e0139386.
- Munderloh UG, Kurtti TJ. Emerging and re-emerging tick-borne diseases: new challenges at the interface of human and animal health. Washington, Instituto of Medicine, 2010, pp. 17.
- Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA.. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol*. 2012; 190(3-4): 547–555.
- Nava S, Estrada Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MP, Venzal JM, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone, AA. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet Parasitol*. 2015; 208(1-2), 2–8.
- Oteo JA, Nava S, De Sousa R, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, Labruna M, Zavala Castro J. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev Chilena Infectol*. 2014; 31(1): 54–65.
- Otranto D, Dantas Torres F, Breitschwerdt E. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol*. 2009; 25(4): 157–163.
- Pacheco RC, Moraes Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabó MPJ, Catroxo MHB, Bouyer DH, Labruna MB. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(15): 5207–5211.
- Parola P, Raoult D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 897–928.
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(4): 657–702.
- Randolph SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*. 2004; 129 Suppl S37–S65.
- Relman DA, Falkow S. Perspectiva molecular de la patogenicidad microbiana. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editores) *Enfermedades Infecciosas: Principios y prácticas*. 6ta Edición. Madrid, España, Ed. Elsevier, 2006, p. 3–14.

- Renvoisé A, Delaunay P, Blanchouin E, Cannavo I, Cua E, Socolovschi C, Parola P, Raoult D. Urban family cluster of spotted fever rickettsiosis linked to *Rhipicephalus sanguineus* infected with *Rickettsia conorii* subsp. *caspia* and *Rickettsia massiliae*. Ticks Tick Borne Dis. 2012; 3(5-6): 388–391.
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50: 1449–1455.
- Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. Veterinary Research. 2009; 40(2): 34.
- Venzal JM, Nava S. El género *Rickettsia* como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. Rev Med Urug. 2011; 27: 98–106.
- Vu Hai V, Almeras L, Socolovschi C, Raoult D, Parola P, Pagès F. Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: Available tools and promising future methods. Ticks Tick Borne Dis. 2014; 5(6): 607–619.