

**ESTUDIO DE LA RICKETTSIOSIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS EN ZONAS
RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA Y LA IMPORTANCIA DE
Amblyomma patinoi EN LA EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD**



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

| VIGILADA MINEDUCACIÓN |

HEIDY CAROLINA MARTINEZ DIAZ

TUTORA

MARYLIN HIDALGO, M.Sc, Ph.D.

COTUTOR

ALEJANDRO RAMÍREZ HERNANDEZ M.Sc, Ph.D.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ. D.C., COLOMBIA
ENERO DE 2022**

**ESTUDIO DE LA RICKETTSIOSIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS EN ZONAS
RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA Y LA IMPORTANCIA DE *Amblyomma*
patinoi EN LA EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD**



| VIGILADA MINEDUCACIÓN |

HEIDY CAROLINA MARTINEZ DIAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Doctorado
en Ciencias Biológicas**

TUTORA

MARYLIN HIDALGO, M.Sc, Ph.D.

COTUTOR

ALEJANDRO RAMÍREZ HERNANDEZ M.Sc, Ph.D.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ. D.C., COLOMBIA
ENERO DE 2022**

ESTUDIO DE LA RICKETTSIOSIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS EN ZONAS RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA Y LA IMPORTANCIA DE *Amblyomma patinoi* EN LA EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

APROBADO



[VIGILADA MINEDUCACIÓN]



MARYLIN HIDALGO, M.Sc, Ph.D.
Tutora

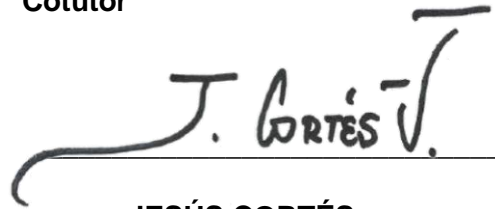


ALEJANDRO RAMÍREZ M.Sc, Ph.D
Cotutor



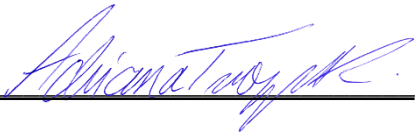
GINA POLO

Jurado



JESÚS CORTÉS

Jurado



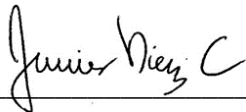
ADRIANA TROYO

Jurado



FRANCISCO BORGES

Jurado



FRANCISCO DIAZ

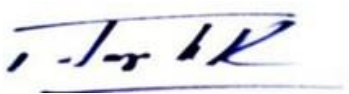
Jurado

ESTUDIO DE LA RICKETTSIOSIS TRANSMITIDA POR GARRAPATAS EN ZONAS RURALES DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA Y LA IMPORTANCIA DE *Amblyomma patinoi* EN LA EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD



| VIGILADA MINEDUCACIÓN |

HEIDY CAROLINA MARTINEZ DIAZ



Alba Alicia Trespalacios. PhD.

Decana

Facultad de Ciencias



Jairo Sutachan Rubio. PhD.

Director de Posgrados

Facultad de Ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

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

AGRADECIMIENTOS

Llegar a este punto me llena de felicidad, regocijo y un enorme agradecimiento, con Dios, con la vida y con las personas que de una u otra forma me han apoyado en este largo camino.

A mi mamá, por su apoyo incondicional e infinito amor, por creer en mí y por ser mi mayor fuente de motivación y esperanza. A mis hermanas por su apoyo, por estar siempre ahí, siempre dispuestas. A mis sobrinos por su enorme cariño, amor y motivación.

A mi tutora la Dra. Marylin Hidalgo, gracias por todo, han sido años de enseñanza en todos los aspectos y en todos los niveles, definitivamente mi gran maestra.

A mis compañeras de laboratorio Paola Betancourt, Juliana Gil y Angela Muñoz, por su compañía, apoyo y enorme colaboración.

A mi cotutor y evaluadores, por su tiempo y aportes.

A mis compañeros del Laboratorio de Bacteriología Especial que hicieron parte de este proceso.

A mis profesoras especialmente Claudia Cuervo, Claudia Parra y Alba Alicia Trespalacios, gracias por sus consejos motivadores y enseñanzas.

A todo el personal administrativo de la facultad y de la Universidad Javeriana que siempre estuvieron dispuestos a colaborar en todo tipo de trámite.

Al profesor Marcelo Labruna y Andrea Fogaça por su paciencia, enseñanzas y por permitirme trabajar en sus laboratorios durante mi tiempo de pasantía en la Universidad de São Paulo. A Eliane Esteves y a todo el equipo de trabajo de los laboratorios gracias por el apoyo y colaboración durante mi estadía en Brasil.

A ti Nelson Fernando, gracias por tu apoyo, paciencia, amor y compañía.

A Adriana Olaya y Eliana Bolaños y por la colaboración en las salidas de campo en el Cauca

A los técnicos de saneamiento, líderes sociales, a las auxiliares y comunidad en general de las regiones donde se realizó el trabajo de campo.

A los doctores, Efraín Benavides, Alberto Acosta y Elkin Forero, por sus contribuciones.

A todas las personas que conocí y con las que creé un lazo de amistad, gracias.

Quiero agradecer de manera especial, también a las instituciones que hicieron parte de este proceso

A la Pontificia Universidad Javeriana; Universidad de São Paulo; The World Academy of Sciences; Secretaría Departamental de Salud del Cauca; Secretarías municipales de Salud y Centros de Salud de los municipios de La Sierra, Caloto, El Tambo y Santander de Quilichao en el Cauca y por último sin ser menos importante a Minciencias por mi beca doctoral.

CONTENIDO

CONTENIDO	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1. JUSTIFICACIÓN	16
2. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1 Rickettsias del Grupo de las Fiebres Manchadas.....	19
2.2 Patogénesis de las rickettsias	21
2.3 Garrapatas (Ixodida)	23
2.4 Distribución de garrapatas relacionadas con la transmisión de <i>Rickettsia</i>	25
2.5 Papel de los animales en la transmisión de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.	26
2.6 Competencia Vectorial	28
2.8. Garrapatas y sistema inmune.....	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo general	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. METODOLOGÍA.....	32
4.1 Área geográfica de estudio.....	32
4.2 Población y muestra.....	36
4.3 Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en humanos y animales.	36
4.3.1 Cálculo de factores asociados.....	37
4.4 Identificación de especies de <i>Rickettsia</i> , presentes en garrapatas recolectadas de animales domésticos.....	38
4.4.1 Organización de pools y clasificación taxonómica de garrapatas.	39
4.4.2 Extracción y cuantificación de DNA	39
4.4.3 Identificación molecular de garrapatas	40
4.4.4 Detección molecular de genes de <i>Rickettsia</i>	41
4.5 Identificación de la frecuencia de rickettsiosis en pacientes sintomáticos febriles de una zona priorizada del departamento del Cauca	43
4.5.1. Selección del centro de salud.....	43
4.5.2 Desarrollo del estudio de vigilancia centinela	44

4.6	Análisis estadístico.....	45
4.7	Evaluar la Competencia Vectorial de <i>Amblyomma patinoi</i> infectada con <i>Rickettsia rickettsii</i> en condiciones de laboratorio.....	45
4.8	Estudiar la expresión de genes relacionados con el sistema inmune <i>en Amblyomma patinoi</i> infectada con <i>Rickettsia rickettsii</i> en condiciones de laboratorio.	46
4.8.1	Estandarización.....	46
4.8.1.1.	Procesamiento.....	47
4.8.1.2.	Selección de secuencias codificantes de DNA (CDS).....	47
4.8.2	Análisis de expresión.....	49
4.8.2.1	Selección de las muestras	49
	Larvas.....	49
	Cuantificación del gen rickettsial <i>gltA</i>	49
	Síntesis del cDNA.....	50
	Ninfas.	50
	Obtención de intestino y glándula salival de adultos	50
	Selección	50
	Extracción de intestino (MG) y glándulas salivales (GS).....	50
4.8.3.	Cálculo de expresión relativa.....	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Población	52
5.2	Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias transmitidas por garrapatas en humanos	53
5.2.1	Factores asociados	55
5.3	Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales	55
5.3.1	Detección de anticuerpos en perros	55
5.3.2	Detección de anticuerpos en caballos	56
5.4	Identificar las especies de <i>Rickettsia</i> , presentes en garrapatas recolectadas de animales domésticos de zonas rurales del departamento del Cauca.	58
5.4.1	Identificación molecular de garrapatas	60
5.4.2	Detección molecular de genes de <i>Rickettsia</i>	67
5.4.3	Construcción de árbol filogenético.....	68
5.4.4	Tasa de infección mínima.....	69
5.5	Identificación de la frecuencia de rickettsiosis en pacientes sintomáticos febriles de una zona priorizada del departamento del Cauca	70
5.6	Evaluación de la Competencia Vectorial de <i>Amblyomma patinoi</i> infectada con <i>R. rickettsii</i> en condiciones de laboratorio.....	71

5.7 Estudio de la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en <i>A. patinoi</i> infectada con <i>R. rickettsii</i> en condiciones de laboratorio.	72
5.7.1. Estandarización.....	72
5.7.2. Ensayos con larvas	75
5.7.3. Ensayos con ninfas	75
5.7.4. Ensayos con intestino.....	79
5.7.5. Ensayos con glándula salival.....	79
6 DISCUSIÓN.....	79
7 CONCLUSIONES.....	91
8 RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES.....	92
9 BIBLIOGRAFÍA.....	93
10. ANEXOS	114
Anexo 1. Consentimiento informado humanos	114
Anexo 2. Encuesta datos demográficos	117
Anexo 3. Consentimiento animales	119
Anexo 4. Protocolo Inmunofluorescencia	120
Anexo 5. Artículo competencia vectorial.....	121
Anexo 6. Protocolo Síntesis de cDNA	121
Anexo 7. Cálculos WinEpi	122
Anexo 8 Publicaciones	132
Artículo 1	132
Artículo 2.....	133
Artículo 3.....	134
Artículo 4.....	135
Artículo 5.....	136
Artículo 6.....	137
Artículo 7	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica departamento del Cauca.....	35
Figura 2. Árbol filogenético del gen 16S-rRNA de <i>A. patinoi</i>	61
Figura 3. Árbol filogenético del gen <i>ITS-2</i> de <i>A. patinoi</i>	62
Figura 4. Árbol filogenético del gen <i>COI-1</i> de <i>A. patinoi</i>	63
Figura 5. Árbol filogenético del gen 16S-rRNA de <i>Dermacentor nitens</i>	64
Figura 6. Árbol filogenético del gen 16S-rRNA de <i>Rh. sanguineus</i> s.l. y <i>Rh. microplus</i> ..	66
Figura 7. Árbol filogenético del gen <i>ompB</i> de <i>Rickettsia</i>	69
Figura 8. α -Macroglobulin en Ninfas	76
Figura 9. Microplusina 22173 en Ninfas.....	76
Figura 10. Péptido antimicrobiano Acaj-74395-37 en Ninfas.....	77
Figura 11. Peritrofina en Ninfas	77
Figura 12. Microplusina 69859 en Ninfas.....	78
Figura 13. Proteína de reconocimiento al peptidoglicano.....	78
Figura 14. Péptido Antimicrobiano en Intestino de adultos.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones geográficas zonas rurales.....	34
Tabla 2. Iniciadores para la identificación molecular de garrapatas	41
Tabla 3. Iniciadores para la detección de genes de <i>Rickettsia</i> sp.	42
Tabla 4. Condiciones de las PCRs	42
Tabla 5. CDSs utilizadas en el proceso de estandarización.....	47
Tabla 6. Características generales de la población.....	52
Tabla 7. Condiciones de vivienda.	53
Tabla 8. Otras características de la población.	53
Tabla 9. Positividad por dilución de anticuerpos en humanos por vereda y municipio	54
Tabla 10. Positividad por título de anticuerpos en perros por vereda y municipio	56
Tabla 11. Positividad por título de anticuerpos en caballos por vereda y municipio	57
Tabla 12. Organización de pooles por especie de garrapata, estadio y hospedero.....	58
Tabla 13. Positividad para <i>Rickettsia</i> spp. por especie de garrapata por municipio	67
Tabla 14 Tasa de infección mínima (MIR) por especie de garrapata	70
Tabla 15. CDSs evaluadas en la estandarización.....	74
Tabla 16. CDSs seleccionadas en la estandarización.....	75

RESUMEN

Las rickettsiosis son entidades clínicas de tipo zoonótico. Actualmente hacen parte de las enfermedades desatendidas en salud humana y animal. Los agentes causales son bacterias del género *Rickettsia* transmitidas por vectores (piojos, pulgas, ácaros picadores y garrapatas) siendo estas últimas el segundo vector más importante después de los mosquitos en la transmisión de agentes infecciosos.

En Colombia el estudio de estas enfermedades se ha concentrado en regiones del centro y noroccidente, mientras en el suroccidente los estudios son escasos. En el departamento del Cauca existen reportes de la presencia de vectores y seropositividad en humanos que podrían indicar un posible comportamiento endémico de esta zoonosis en la región. Teniendo en cuenta esta problemática, el objetivo de este estudio fue estudiar la rickettsiosis transmitida por garrapatas en zonas rurales del departamento del Cauca y la importancia de *Amblyomma patinoi* en la epidemiología de la enfermedad.

Se propuso un estudio transversal en ocho zonas rurales priorizadas concentradas en 4 municipios del departamento de Cauca. Se realizó una visita en todas las casas de las veredas, a las personas que cumplieron con los criterios de inclusión y firmaron el consentimiento informado se les recolectó una muestra de sangre, así como a los animales domésticos (perros y caballos) encontrados en el predio; de igual forma se removieron manualmente las garrapatas encontradas sobre estos.

Se detectaron anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en sueros de animales y humanos; las garrapatas fueron identificadas taxonómicamente por claves morfológicas y molecularmente usando genes específicos (16S-rRNA, *COI-1* y *ITS-2*). A partir del DNA extraído de estas se realizó la búsqueda de genes rickettsiales (*gltA*, *sca5*, *htrA*) y bajo condiciones experimentales se realizaron ensayos de competencia vectorial de *A. patinoi* y un acercamiento del efecto de la infección de *Rickettsia rickettsii* sobre genes seleccionados del sistema inmune en esta garrapata.

Se obtuvo una seropositividad del 85,7%, 80,4% y 90,6% en humanos, perros y caballos respectivamente. Se confirmó la circulación de *Amblyomma patinoi*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus microplus* y *Dermacentor nitens* en la región explorada y se identificó *Rickettsia felis*, *Rickettsia asembonensis* y *Candidatus Rickettsia senegalensis* en *D. nitens*, así como *R. asembonensis* en *A. patinoi*. Así mismo se confirmó la competencia vectorial de

A. patinoi en la transmisión de *R. rickettsii* a hospederos susceptibles en condiciones de laboratorio, donde se evidenció que la presencia de hospederos amplificadores es una condición necesaria para el mantenimiento enzoótico de la bacteria. De otro lado se estableció que la infección por *R. rickettsii* en *A. patinoi*, reprime la expresión de algunos genes importantes del sistema inmune de esta garrapata, los cuales son necesarios en el control de la proliferación de patógenos en sus tejidos.

Con estos hallazgos se confirma la circulación de especies de rickettsias en las zonas rurales seleccionadas en el estudio, así como la presencia y competencia vectorial de uno los vectores más importantes en la epidemiología de la rickettsiosis en Colombia. Son necesarios estudios de mayor alcance en esta región que clarifiquen otros componentes relevantes de esta zoonosis.

ABSTRACT

Rickettsiosis are clinical entities of zoonotic type. Currently, they are part of the neglected illnesses in human and animal health. The causal agents are bacteria of the genus *Rickettsia* transmitted by different vectors (ticks, lice, fleas and biting mites) the latter being the second most important vector in the transmission of infectious agents after mosquitoes.

In Colombia the research of tick-borne diseases has been concentrated in the central and northwestern regions, while in the southwestern part of the country studies are scarce. There are reports of the presence of vectors and seropositivity in humans in the department of Cauca that could indicate a possible endemic behavior of this zoonosis in this region. Considering these antecedents, the objective of this study was study tick-borne rickettsiosis and the importance of *A. patinoi* in the epidemiology of the disease in rural areas of the department of Cauca.

A cross-sectional study was proposed in eight prioritized rural areas, focusing in 4 municipalities in the department of Cauca. House-to-house sampling was carried out in the rural areas and blood samples were collected from humans who met the inclusion criteria and signed the informed consent and domestic animals (dogs and horses), as well as manual removal of feeding ticks on the sampled mammals. IgG antibodies against spotted fever group rickettsiae were detected in animal and human sera; ticks were identified taxonomically by morphological keys and molecularly using specific genes (16S-rRNA, *COI-1* and *ITS-2*). From the DNA extracted from these, the search for rickettsial genes (*gltA*, *sca5*, *htrA*) was carried out and under experimental conditions, tests of vector competence of *A. patinoi* and an approach of the effect of the infection of *Rickettsia rickettsii* on selected genes of the immune system in this tick were carried out.

A seropositivity of 85,7%, 80,4% and 90,6% was obtained in humans, dogs and horses, respectively. The circulation of *Amblyomma patinoi*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* in the explored region was confirmed and *Rickettsia felis*, *Rickettsia asembonensis* and *Candidatus Rickettsia senegalensis* in *D. nitens*, as well as *R. asembonensis* in *A. patinoi*. Likewise, the vector competence of *A. patinoi* was confirmed in the transmission of *R. rickettsii* to susceptible hosts under laboratory conditions, where it was evidenced that the presence of amplifying hosts is a necessary condition for the enzootic maintenance of the bacteria.

On the other hand, it was established that the infection of *R. rickettsii* in *A. patinoi*, represses the expression of some important genes of the immune system of this tick, which are necessary in the control of the proliferation of pathogens in its tissues.

These findings confirm the circulation of rickettsial species in the rural areas selected in the study, as well as the presence and vector competence of one of the most important vectors in the epidemiology of rickettsiosis in Colombia. Larger studies are needed in this region to clarify other relevant components of this zoonosis.

1. JUSTIFICACIÓN

Desde inicios del siglo XXI, el mundo se enfrenta a un panorama cambiante de enfermedades zoonóticas, que se han convertido en desafíos para la Salud Pública junto con sus agentes transmisores, especialmente por el resurgimiento de ciertos artrópodos como chinches y la expansión en rango de mosquitos y garrapatas (1). Datos publicados por el CDC (*Centro para el Control y prevención de Enfermedades de Atlanta*), sobre patógenos transmitidos por vectores en Estados Unidos entre el 2004 y el 2016, destaca el incremento de los transmitidos por garrapatas, los cuales representan el 77% del total de los reportes de enfermedades transmitidas por vectores (2).

Las garrapatas, después de los mosquitos son el segundo vector más importante de patógenos, que causan enfermedades en humanos y animales (3–5), su éxito en la transmisión de patógenos, está dada principalmente por aspectos favorables de su fisiología, determinada por la adaptación a una alimentación prolongada y la modulación de la respuesta inmune del hospedero, entre otros, lo que facilita la adquisición y transmisión de patógenos (6,7).

Adicionalmente, las garrapatas tienen gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes y son ampliamente versátiles en cuanto a la variedad de agentes potencialmente patógenos que pueden transmitir, los cuales son adquiridos durante su proceso de alimentación sanguínea y que junto con los microorganismos simbioses pueden influir en el *fitness*, desarrollo, reproducción, nutrición y susceptibilidad de infección de estos artrópodos y por ende en su capacidad vectorial (8–12). Gracias a los avances en técnicas de biología molecular y análisis bioinformáticos, se han podido establecer los cambios moleculares y genes involucrados en la sobrevivencia de las garrapatas, propagación, metabolismo, sistema inmune, entre otros, importantes en el entendimiento de la interacción vector-patógeno (9,13–16). Todos estos aspectos, han generado gran interés en la comunidad científica, académica y en las autoridades de Salud Pública (1,6,7), ya que a pesar de los hallazgos, aún existen elementos por dilucidar en cuanto a la biología de las garrapatas y su rol en la transmisión de patógenos.

Las rickettsiosis son enfermedades infecciosas zoonóticas emergentes y re-emergentes, causadas por bacterias patógenas del género *Rickettsia* y transmitidas al humano a través de artrópodos vectores como garrapatas, pulgas, piojos y ácaros (17). La presentación clínica de rickettsiosis en humanos depende de la especie de *Rickettsia* implicada, e incluye desde un síndrome febril agudo inespecífico leve, hasta la presentación de una amplia gama de manifestaciones clínicas que puede llegar a ser letal cuando el tratamiento no es oportuno y adecuado (18,19).

En Colombia se han realizado estudios encaminados al entendimiento de las rickettsiosis. Los cuales iniciaron en los años 30 por el Dr. Patiño Camargo (20), seguidos por el reporte de casos ocurridos en el 2004 en Villeta, y la presentación de brotes en Necoclí en el 2006, los Córdoba en el 2007 y Turbo en el 2008 (21–24), en los cuales la especie implicada fue *R. rickettsii*. También se han reportado nuevas especies de garrapatas potencialmente transmisoras de *R. rickettsii*, como *Amblyomma patinoi*, a partir de la cual lograron el aislamiento por cultivo en el 2015 (25) y *A. mixtum* en la cual han identificado molecularmente su presencia (26). Además, se han reportado especies nuevas *Candidatus Rickettsia* y posibles hospederos mamíferos amplificadores, así como nuevas zonas endémicas para rickettsiosis en el país (25–32).

El departamento del Cauca es una región ubicada al sur occidente del territorio nacional, el cual reúne las condiciones ambientales, climáticas y ecológicas propicias para la proliferación de garrapatas y sus posibles patógenos. La secretaria Departamental de Salud del Cauca, a partir de un estudio de campo realizado en el 2013, donde se notificó la circulación de garrapatas importantes en la epidemiología de la rickettsiosis como *A. patinoi* y *Amblyomma* sp., además de una seropositividad (contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas) en humanos del 49% y 17% en los municipios de La Sierra y Rosas, respectivamente, así como la detección de tres casos activos confirmados por seroconversión (33), manifestó la necesidad de conocer su situación frente a esta problemática en ocho zonas priorizadas con presencia de garrapatas y notificaciones de picaduras en humanos. Teniendo en cuenta lo anterior, surgió la necesidad de explorar su situación abordando otros aspectos importantes en la epidemiología de esta zoonosis. Actualmente se sabe a partir del estudio publicado por Weber *et al.*, 2020 que en una zona rural del municipio del Tambo en la frontera con el municipio de La Sierra, existe una seropositividad del 79% en humanos, además está el

registro de las reacciones alérgicas observadas en el 94,5% de la población muestreada, debido a picaduras constantes de garrapatas a las cuales está expuesta la población (34).

Sin embargo, pese a los antecedentes en nuestro país, este tipo de enfermedades no son consideradas en el diagnóstico diferencial de los síndromes febriles, ni están incluidas en las enfermedades de notificación obligatoria fijadas por el Ministerio de Salud y Protección Social. Adicionalmente no se ha determinado el papel vectorial de las potenciales garrapatas transmisoras de agentes rickettsiales como es el caso de *A. patinoi*, ni los cambios moleculares que estas podrían presentar durante la infección con *R. rickettsii*. Lo anterior podría contribuir en establecer el papel que pueden cumplir estos artrópodos en la epidemiología de la enfermedad y así poder generar planes y estrategias encaminadas en la mitigación de la proliferación de estos agentes en zonas endémicas.

Es así como surge la necesidad de evaluar la circulación de bacterias del género *Rickettsia* transmitidas por garrapatas en zonas rurales del departamento del Cauca, determinar la competencia vectorial y realizar una aproximación sobre el potencial efecto que tiene la infección por *R. rickettsii* en la expresión de genes del sistema inmune de *A. patinoi* en condiciones de laboratorio.

2. MARCO TEÓRICO

En los últimos años se ha presentado un incremento a nivel mundial de las enfermedades infecciosas ocasionadas por diversos microorganismos, este fenómeno es debido principalmente a cambios ambientales, cambios en la agricultura, en la producción de alimentos y en la movilización demográfica global (1). Dentro de estas enfermedades emergentes y re-emergentes se destacan las zoonosis responsables de un gasto global directo de \$20 billones e indirecto en \$200 billones entre 2000 y 2010 (1). Para la enfermedad de Lyme en Estados Unidos en el 2015 se estimó que los costos médicos asociados a la atención y tratamiento podrían representar cerca de 1.3 billones de dólares cada año los cuales incrementan cuando hay falla terapéutica y el paciente retorna al centro de salud (35). Así mismo Dexler y colaboradores 2015, calcularon los costos directos e indirectos asociados a la atención de fiebre manchada de las montañas rocosas en Arizona y reportaron un valor de \$13.184.968 dólares entre el año 2002 a 2011 (36). Se estima además que el 60% de las enfermedades en seres humanos y entre un 60% a 75% de nuevas patologías emergentes corresponden a zoonosis (1).

En el informe publicado por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta en el 2018 (2) sobre los casos de enfermedades transmitidas por vectores en Estados Unidos entre los años 2004 al 2016, genera gran preocupación ya que resalta que durante este tiempo las enfermedades transmitidas por garrapatas a humanos se duplicaron y representaron el 77% del total de los casos, de estos el 82% atribuidos a la enfermedad de Lyme, y el restante a enfermedades como babesiosis, anaplasmosis, ehrlichiosis y rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas (2).

Las rickettsiosis son enfermedades infecciosas zoonóticas emergentes y re-emergentes, causadas por bacterias patógenas del género *Rickettsia* y *Orientia*, transmitidas al humano a través de artrópodos vectores como garrapatas, pulgas, piojos y ácaros (17). La epidemiología de estas enfermedades está relacionada con tres componentes fundamentales, entre ellos la circulación del vector, de un hospedero amplificador y de condiciones ecológicas y/o sociales que faciliten la exposición de humanos (37). Es así como algunas especies de *Rickettsia*, en especial las transmitidas por garrapatas, se restringen a las zonas donde circula el vector, como es el caso de *R. rickettsii*, limitada al continente americano o *R. conorii*, distribuida únicamente en los países alrededor del mar Mediterráneo y del mar Negro (38).

2.1 Rickettsias del Grupo de las Fiebres Manchadas

Las bacterias del género *Rickettsia* pertenecen al reino Bacteria; Filum Proteobacteria; Clase α -proteobacterias; Orden Rickettsiales y Familia Rickettsiaceae (39). Se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos, aerobios, intracelulares obligados, los cuales sobreviven y se dividen en las células eucariotas mediante fisión binaria (39,40). En los invertebrados pueden infectar las células de glándulas salival, intestino, hemolinfa y ovario (41,42) y en los vertebrados las células endoteliales de pequeños vasos sanguíneos, ocasionando una vasculitis (43).

Debido a diversas características biológicas, genéticas y de filogenia, las especies de este género se han agrupado en 4 grupos: grupo de las fiebres manchadas (SFG) transmitido por garrapatas, cuya especie más representativa en el continente Americano es *Rickettsia rickettsii*; grupo del Tifus (TG), representado por *Rickettsia prowazekii* transmitida por piojos y *Rickettsia typhi* por pulgas; grupo ancestral (AG) transmitido por garrapatas, representado por *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*, las cuales hasta la fecha no están relacionadas con

enfermedad en humanos; grupo transicional (TRG) representado por *Rickettsia akari*, y *Rickettsia felis* transmitidas por ácaros y pulgas, respectivamente (44).

Rickettsia rickettsii, la especie más patógena del SFG, es el agente causal de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas también conocida como Fiebre Maculosa en Brasil o Fiebre de Tobia en Colombia. La sintomatología de la fiebre manchada o rickettsiosis es variada y se presenta con una amplia gama de manifestaciones; puede iniciar entre el día 3 al 14 posterior a la picadura de la garrapata infectada y se caracteriza por un síndrome febril agudo, seguido por escalofríos, dolor de cabeza intenso, malestar general, exantema tipo macular, dolores articulares y musculares (18,19,45–48). Datos publicados por el *Centro para el Control y Prevención de Enfermedades* (CDC), señala que también se puede observar edema alrededor de los ojos y en el dorso de las manos, así como síntomas gastrointestinales como náuseas, vómito y anorexia (49). Después de cinco días sin tratamiento adecuado la rickettsiosis puede alterar el estado mental de la persona, afectar el sistema respiratorio y generar una falla multiorgánica (49).

R. rickettsii está restringida al Continente Americano y a la fecha ha sido reportada en países como Argentina, Brasil, Colombia, Panamá, Costa Rica, México, Estados Unidos y Canadá (50–57); En muchos de los cuales, su detección fue realizada durante la primera mitad del siglo XX y, después de un largo periodo de silencio epidemiológico, re-emerge como un problema de Salud Pública hasta finales del S. XX y comienzos del S. XXI (58); hasta ese momento la única rickettsiosis transmitida por garrapatas en el continente Americano era ocasionada por *R. rickettsii*, (50), pero desde el año 2004, *Rickettsia parkeri* fue implicada como agente causal de fiebres manchadas en América, lo que sugiere que pueden existir otras especies patógenas (59–61).

En Colombia, los reportes de rickettsiosis datan de 1935, cuando el Doctor Luis Patino Camargo reportó en la localidad de Tobia (Cundinamarca), un brote de enfermedad febril, con caso-fatalidad del 95%. De acuerdo con los hallazgos clínicos, el comportamiento en animales de experimentación posterior a la inoculación de sangre de personas enfermas y al aislamiento de la bacteria, se determinó que era una enfermedad similar a la fiebre manchada de las Montañas Rocosas de Norteamérica, y se denominó fiebre de Tobia (20).

Posterior a un silencio epidemiológico aproximado de 70 años se reanudó el interés por estas enfermedades con la descripción de múltiples brotes de alta letalidad por *R. rickettsii* en los

departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Los Córdoba entre los años 2004 al 2008 (21–24), así como el reporte de un caso fatal en Chigorodó (Antioquia) en el 2017 (62) y otro caso de rickettsiosis en el 2020 por *R. parkeri* en el Urabá Antioqueño (61)

Debido al avance de las técnicas de biología molecular y al desarrollo del cultivo de estos microorganismos, en las últimas décadas se ha producido un incremento en la descripción de nuevas especies y de Candidatus a nuevas especies. Algunas de ellas, previamente consideradas no patógenas han demostrado su patogenicidad en humanos. Este es el caso de *Rickettsia slovacica*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae* *R. monacensis* en Europa (63) y *R. parkeri* en América (60,61); es así como la descripción de otras especies de *Rickettsia* con poder patógeno ha cambiado la percepción del riesgo y extensión de estas afecciones en el mundo (64,65).

2.2 Patogénesis de las rickettsias

Cuando las bacterias ingresan al hospedero humano después de ser inoculadas desde las glándulas salivales de la garrapata durante su alimentación (entre 6 y 24 horas continuas de hematofagia), los patógenos invaden y proliferan mediante fisión binaria en el citoplasma y núcleo de las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos de pequeño y mediano calibre, sin embargo, las rickettsias pueden infectar otras células como monocitos, macrófagos y en menor proporción a los hepatocitos (66,67).

Las rickettsias entran a la célula mediante fagocitosis inducida dado que poseen dos proteínas de membrana externa que son OmpA (*sca0*) y ompB (*sca5*) que junto a las proteínas *sca1*, *sca2* y otros lipopolisacáridos le permiten la adhesión a la célula. Cabe destacar que OmpA, ompB, *sca1* y *sca2* pertenecen a una familia de proteínas de membrana externa denominada “autotransportadoras” las cuales son encontradas en bacterias Gram negativas (66). OmpB es una proteína que se encuentra presente en todas las especies del género *Rickettsia* y actúa como ligando para Ku70, una proteína kinasa localizada en citoplasma y membrana (66–69).

Estudios realizados con *R. conorii*, han concluido que la interacción entre Ku70 – ompB es suficiente para mediar la internalización en células no fagocíticas, por ejemplo, las células endoteliales, puesto que recluta a una ligasa de ubiquitina que es necesaria para conducir a un rearrreglo del citoesqueleto en el sitio de adhesión de la célula (66,67,69,70). Una vez dentro

de las células, las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas usan enzimas como la fosfolipasa C y la hemolisina D, codificadas por los genes *pld* y *thyC* respectivamente, que lisan la membrana del fagosoma antes de que se una con el lisosoma y rápidamente escapan al citoplasma de la célula donde adquiere nutrientes básicos como glutamato, aminoácidos, nucleótidos y ATP necesarios para su crecimiento. El proceso patogénico de *Rickettsia* es realizado por medio de sistemas de secreción como el T4SS (66,69). Adicionalmente, en el citoplasma la bacteria expresa la proteína Sca2 o también llamada Rick-A que recluta al complejo Arp2/3 que se encarga de polimerizar los filamentos de actina y permitir su movimiento a lo largo de las células endoteliales adyacentes generando una vasculitis, así como influir en la entrada al núcleo donde se pueden dividir mediante fisión binaria (66,67,69,71).

Este movimiento basado en la polimerización de la actina se da a una velocidad de 4.8 $\mu\text{m}/\text{minuto}$, dicha diseminación rápida hace que las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas rara vez se acumulen en una misma célula, siguiendo un patrón de infección similar al usado por bacterias como *Shigella* o *Listeria* (71,72).

Luego que las células endoteliales han sido infectadas se producen grandes cantidades de citocinas pro – inflamatorias como IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, TNF- α , prostaglandinas, IFN- γ , GM-CSF, PDGF, M-CSF e ICAM-1. Existen dos citocinas que son bactericidas para las rickettsias, estas son el TNF- α y el IFN- γ dado que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) aunque también favorezcan el daño endotelial (40,66,69,73). Posteriormente, inicia la respuesta inmune adaptativa donde hay un predominio de la respuesta mediada por LTh1, es decir, se produce una respuesta de tipo celular con incremento en TNF- α e IFN- γ producido por dichos linfocitos y células NK, así mismo se favorece la activación de LTCD8 citotóxicos necesarios para obtener una óptima respuesta inmune contra las rickettsias. Respecto a la respuesta humoral o Th2, esta se genera por la presentación de antígenos provenientes de las proteínas OmpA y OmpB a los linfocitos B.

Los anticuerpos producidos contra estos dos antígenos son muy importantes dado que generan una protección en casos de reinfección y contribuyen a la eliminación de las rickettsias en el periodo de convalecencia de la enfermedad (73). Sin embargo, también se producen anticuerpos contra antígenos timo independientes como el lipopolisacárido (LPS), estos

anticuerpos son no protectores contra la infección y generan reacción cruzada entre rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (71).

2.3 Garrapatas (Ixodida)

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados que en una parte de su ciclo de vida se alimentan de mamíferos, aves, reptiles y algunos anfibios; son consideradas el segundo vector más importante después de los mosquitos en la transmisión de enfermedades infecciosas a humanos y están implicados en casos de parálisis, toxicosis y reacciones anafilácticas, así como en la transmisión incidental de microorganismos patógenos como bacterias y protozoos a animales y humanos (74–76).

La vía de transmisión de agentes infecciosos a hospederos vertebrados susceptibles se da principalmente a través de la saliva de la garrapata durante el proceso de alimentación sanguínea (47). Una vez la garrapata asciende al hospedero e inicia el proceso de alimentación requiere un periodo mínimo de 4 a 6 horas para que la transmisión de la bacteria sea efectiva, aunque para que sea realmente eficaz, deberá prolongarse por lo menos de 22 a 24 horas siendo óptima 48 horas de fijación (57,76,77).

Los mecanismos de transmisión entre artrópodos se dan esencialmente por perpetuación transtadial, (entre estadios) transmisión transovarial (de la hembra infectada a su prole) (41,42) o por co-alimentación (Transmisión horizontal), esta última relacionada con la infección que ocurre durante el proceso de alimentación por cercanía de garrapatas no infectadas con garrapatas infectadas (78–80). Estos mecanismos son considerados esenciales en la ecología de *Rickettsia* (57,81).

Las garrapatas se pueden encontrar en todas las regiones del planeta, con una gran diversidad en regiones tropicales y subtropicales (19,73,74). Se estima que existen alrededor de 955 especies de garrapatas distribuidas en tres familias así: 736 pertenecen a Ixodidae, 218 a Argasidae y 1 a Nuttalliellidae (81). En la región neotropical hay descritas 200 especies de las cuales 116 pertenecen a la familia Ixodidae (82–84) y 84 a la familia Argasidae (82,83,85). La familia Ixodidae se distingue por la presencia de placas o escudos de quitina por lo cual se les

conoce usualmente como garrapatas “duras o acorazadas”. Las características morfológicas y/o biológicas de los Ixódidos permiten que haya una subdivisión en garrapatas de rostro corto o largo y en garrapatas de uno, dos, o tres hospederos. Las garrapatas de rostro largo tienen el segundo segmento de los palpos más largo que ancho, y las de rostro corto, este segundo segmento es tan largo como ancho (73,86). Las garrapatas de un solo hospedero: son aquellas que cumplen su ciclo de vida sin cambiar de hospedero, abandonándolo solamente cuando están completamente alimentadas y desprendiéndose de éste para ovipositar en el suelo. Las garrapatas de dos hospederos desarrollan sus fases de larva y ninfa en uno solo y lo abandonan para mudar en el suelo, transformándose en adultas para buscar un segundo hospedador y completar su ciclo de vida. Finalmente, las garrapatas de tres hospedadores se caracterizan porque utilizan un hospedero diferente para el proceso de alimentación de cada uno de sus tres estadios de vida y realizan la muda fuera de este (73,86).

Las garrapatas de la familia Argasidae, cuentan con aproximadamente 189 especies en el mundo; se identifican por no poseer engrosamientos cuticulares, por lo cual se les denomina garrapatas “blandas o coriáceas”, las cuales además de encontrarse en mamíferos, también se encuentran parasitando aves; se caracterizan por un dimorfismo sexual poco marcado, por la localización de los estigmas entre la tercera y cuarta pata, por las piezas bucales atrofiadas en adultos y por la ausencia de áreas porosas en las hembras. Por último, se incluye la familia Nuttalliellidae, la cual posee características intermedias entre las familias Argasidae e Ixodidae, y está compuesta actualmente por una sola especie reportada en África (*Nuttalliella namaqua*) (74,82).

En Colombia, las primeras referencias sobre garrapatas aparecen en descripciones de las colecciones entomológicas de Osorno Mesa (1939), donde se realiza la descripción de varias especies, sus hospederos y lugares de ocurrencia, al igual que claves taxonómicas para su identificación (83). Debido al clima tropical del país se favorece la presencia de diversas especies de garrapatas entre ellas, de los géneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma* y *Dermacentor*, de gran importancia en salud humana y animal (84–86).

Así mismo está documentado que existen especies que podrían estar incriminadas en la transmisión de rickettsias en el país, entre ellas *Amblyomma dissimile* con *Rickettsia* sp.

cepa Colombianens (27), *A. cajennense* con *Rickettsia* sp. (29), *A. ovale* con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest (28) *A. patinoi* y *A. mixtum* con *R. rickettsii* (25,26).

2.4 Distribución de garrapatas relacionadas con la transmisión de *Rickettsia*.

Diferentes especies de garrapatas han sido descritas como vectores, reservorios o amplificadores de bacterias como *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Borrelia*, entre otras, donde su distribución y ecología tienen gran impacto en la epidemiología de estas enfermedades (86,87).

En Norte América, los principales vectores asociados a la transmisión de *Rickettsia* son *Dermacentor andersoni* en la región occidental y *Dermacentor variabilis* en la región oriental de Estados Unidos (88–90), así como *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) en áreas del estado de Arizona en Estados Unidos y Norte de México (89) y *Amblyomma americanum* en el Noreste de Estados Unidos (91).

En Latinoamérica y el Caribe, las especies de garrapatas implicadas están incluidas dentro de los géneros *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* y *Dermacentor* (50,92). El complejo *Amblyomma cajennense* s.l., comprende seis especies definidas como vectores principales de *R. rickettsii* en algunas áreas de centro y sur América (57,93), las cuales son morfológica y genéticamente similares y están distribuidas en diferentes regiones desde Texas hasta el Norte de Argentina así: *A. cajennense* sensu stricto (distribuida en la Región Amazónica), *A. mixtum* (desde Texas hasta la región occidental de Ecuador), *A. sculptum* (Norte de Argentina, Bolivia, Paraguay y Brasil), *A. interandinum* (Valle Interandino de Perú), *A. tonelliae* (regiones secas del norte de Argentina, Bolivia y Paraguay) y *A. patinoi* (Colombia) (93,94). Estas especies se alimentan de una variedad de hospederos, principalmente mamíferos domésticos y algunos silvestres de mediano y gran tamaño (94,95); este complejo contiene además algunas de las garrapatas antropofílicas más importantes de la región Neotropical (96).

Amblyomma aureolatum ha sido reportada en Brasil y países de Sur América donde las condiciones de temperatura y humedad son favorables para su reproducción (97), la cual actualmente es el principal vector de *R. rickettsii* en el Área Metropolitana del estado de São Paulo (57). Otras especies de *Amblyomma* como *A. triste* y *A. ovale*, están relacionadas como vectores de *R. parkeri* en Sur América (98–100).

Rh. sanguineus comúnmente identificada como la garrapata marrón del perro, no sólo ha sido reportada como potencial vector en el este de Arizona (89). Se ha reportado así mismo positiva para genes de *Rickettsia* en Estados Unidos (101), México (102–104), Brasil (105), y Argentina (106,107). Estudios realizados en Brasil han inferido que es posible que esta especie pueda representar un riesgo potencial de transmisión de *R. rickettsii* a humanos (108). Así mismo, *Haemaphysalis* ha sido reportada como posible vector de *Rickettsia* en Brasil (109–111) Canadá (112) y Costa Rica (54) y *Dermacentor nitens*, en Panamá (113,114).

A. mixtum y *A. patinoi* han sido reportadas como potenciales vectores de *R. rickettsii* en Colombia en la región oriental y central del país, respectivamente, al ser identificadas en zonas endémicas de rickettsiosis y por la identificación molecular de esta bacteria por técnicas de biología molecular y cultivo en el caso de *A. patinoi* (25,26).

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

En los caninos, la rickettsiosis es una enfermedad potencialmente fatal en especial si es causada por *R. rickettsii* en perros menores a 3 años (115,116). Al igual que en los humanos, estas bacterias tienen tropismo por las células endoteliales de pequeñas arterias y vénulas generando una vasculitis necrosante, además pueden aparecer síntomas neurológicos, descarga ocular bilateral, edema conjuntival, anorexia, fiebre y letargia que pueden conllevar a la muerte del animal en cuestión de días (116–119). Dado que estos mamíferos son susceptibles a esta enfermedad y son comúnmente parasitados por garrapatas como *Rh. sanguineus* y *A. cajennense*, la determinación de la seropositividad de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en estos, contribuye a obtener información sobre las zonas de alto riesgo para poblaciones humanas (120,121).

Respecto a los factores de riesgo en esta población, Melo *et al*, 2011 reportaron que vivir en áreas rurales, utilizarlos para cacería y el estar infestados con *A. cajennense*, son factores asociados a la infección de caninos por parte de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (122). Por esta razón estos mamíferos son considerados centinelas en las zonas donde pueden circular agentes rickettsiales como *R. rickettsii* (123–125). Pinter *et al.* en 2008, reportaron la importancia de los perros para detectar la presencia de *R. rickettsii* en las zonas donde la garrapata *A. aureolatum* es el principal vector de fiebre manchada en Brasil (126).

En caballos se ha demostrado que estos no desarrollan signos clínicos ni anomalías hematológicas al ser infectados experimentalmente con *R. rickettsii*, pero sí generan anticuerpos IgG contra rickettsias 10 días después de la infección (127), argumentando con esto, que estos animales podrían no ser amplificadores de *R. rickettsii*, en condiciones naturales, pero sí buenos centinelas de infección (127).

Diversos animales silvestres han sido reportados como potenciales amplificadores de rickettsias. En países como Estados Unidos, se ha identificado *Microtus pennsylvanicus* como un amplificador eficiente para *R. rickettsii* dado que es abundante en zonas endémicas de rickettsiosis, es hospedero primario de *D. variabilis* y desarrolla rickettsemias las cuales favorecen la infección de garrapatas durante su proceso de alimentación (128).

En México se ha reportado el hallazgo de *Rickettsia* sp. cepa Colombiense y *Rickettsia amblyommatis* en garrapatas recolectadas de *Boa constrictor* (boa común), *Iguana iguana* (iguana verde) y *Rhinella marina* (sapo de caña), infiriendo con esto que posiblemente especies de anfibios y reptiles que son parasitados por garrapatas, podrían ser hospederos amplificadores de rickettsias (129).

En Brasil, los perros domésticos, las zarigüeyas y los capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), son considerados hospederos amplificadores de *R. rickettsii* (57,130,131). Estudios realizados con capibaras han establecido que este es un hospedero amplificador eficiente de *R. rickettsii* para *Amblyomma sculptum* (miembro del complejo *A. cajennense*) (94,132). Así mismo se ha demostrado que capibaras infectados experimentalmente no desarrollan sintomatología clínica, pero sí desarrollan rickettsemias en la primera infección permitiendo que la garrapata adquiera la bacteria durante su proceso de alimentación, estableciendo con esto el papel que cumple este mamífero en la epidemiología de la enfermedad en zonas endémicas en Brasil (131,133).

En Colombia se han realizados diferentes estudios con el fin de establecer el papel que cumplen los animales domésticos y los silvestres en la epidemiología de la enfermedad, realizando la detección de anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas así como detección de genes de *Rickettsia* sp. En animales domésticos se han reportado porcentajes de seropositividad en diversas regiones del país (134–136), así mismo se ha explorado en animales silvestres la detección de anticuerpos o detección de genes de

Rickettsia sp. (32,134) Miranda *et. al* 2011, establecieron una seroprevalencia de anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas del 22% en chigüiros capturados en zona rural del municipio de Montería, sugiriendo con sus resultados, que estos animales podrían ser usados como potenciales centinelas de la circulación de rickettsias y marcadores de las áreas de riesgo para la transmisión de rickettsiosis (137). Quintero *et. al* en el 2013 reportaron una frecuencia de infección del 6,8% en roedores silvestres (335 individuos); el roedor con la frecuencia de infección más alta fue *Zygodontomys cherriei* con el 12,8%, seguido por *Rattus rattus* con el 5% y la detección de anticuerpos más alta fue reportada en *Rattus rattus* con el 73,5% seguido por *Zygodontomys cherriei* con 16,3% (32) lo cual podría sugerir que estos roedores pueden desempeñar un papel importante en la epidemiología de la rickettsiosis en el país.

Por otro lado, Londoño *et. al* en el 2017 reportaron una seroprevalencia en animales domésticos del 36,8%, en roedores sinantrópicos del 30,3% y en pequeños mamíferos silvestres del 25% contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas; *Didelphis marsupialis*, presentó la seroprevalencia más alta con un 88,9% seguido por *Metachirus nudicaudatus* con el 66,7% (134).

La disponibilidad de hospederos amplificadores vertebrados que desarrollen altas rickettsemias, por periodos de tiempo prolongados es indispensable para el mantenimiento de especies de *Rickettsia* (transmitidos por garrapatas) en su ciclo enzoótico al infectar nuevas garrapatas y generar linajes de garrapatas infectadas (131).

2.6 Competencia Vectorial

La capacidad y la competencia vectorial son a menudo usadas para describir la habilidad de un artrópodo de servir como vector de agentes infecciosos, sin embargo, la capacidad vectorial es influenciada por determinantes ambientales que afectan la densidad del vector, la longevidad y la competencia. La competencia vectorial, es un componente de la capacidad vectorial que depende de factores genéticos que afectan la habilidad del vector para transmitir un patógeno (9,138).

Diversos estudios de infección experimental han permitido corroborar la perpetuación transtadial y transmisión transovárica de *R. rickettsii* en garrapatas de los géneros *D. andersoni*, *D. variabilis*, *A. cajennense* s.l., *A. aureolatum* y *Rh. sanguineus* (50,57,139). Sin embargo y pese a la existencia de mamíferos amplificadores en regiones donde circulan los

diferentes vectores, los porcentajes de infección con *R. rickettsii* reportados en estas especies de garrapatas en condiciones naturales son bajos.

Para *D. variabilis*, Carmichael *et. al.* 2010, reportaron un porcentaje de infección con *R. rickettsii* del 1,78% (140), así mismo estudios posteriores publicados entre los años 2016 al 2021, notificaron infecciones entre 0% hasta 1,3% en esta especie de garrapata recolectada de diferentes regiones de Estados Unidos (141–145).

En *D. andersoni* la mayoría de las publicaciones reportan 0% de infección por *R. rickettsii* en condiciones naturales (146–148) este fenómeno es explicado por el efecto letal que ocasiona esta bacteria en la garrapata lo cual justifica las bajas tasas de infección (149).

De acuerdo con lo publicado por Ribeiro-CM *et. al* 2021, la especie de garrapata frecuentemente infectada en condiciones naturales con *R. rickettsii* es *R. sanguineus* (150). Diferentes regiones de Norte, Centro y Sur América han publicado diversos porcentajes de positividad con esta bacteria. En Panamá, Martínez-Caballero *et. al.* 2018 reportó 8,7% de infección (151), México ha reportado porcentajes de infección en este vector hasta del 31,2% (103,152–154), Brasil del 13,1% (108,150,155) y Estados Unidos del 2,8% (89,156). Durante los último años, esta especie de garrapata ha sido establecida como clave en la dinámica de transmisión de *R. rickettsii* en los ciclos enzoóticos y por lo tanto se infiere que podría estar involucrada en el ciclo de la enfermedad (157,158).

El género *Amblyomma* incluye diversas especies que a lo largo de la historia han sido implicadas como reservorios y potenciales vectores de *R. rickettsii*, este es el caso de *A. aureolatum*, *A. cajennense* s.l., *A. dubitatum*, *A. parvum*, *A. imitator*, *A. sculptum*, *A. mixtum* *A. tonelliae* y *A. patinoi* (25,26,57,132,159–168).

En Brasil, *A. cajennense* ha sido reportado con tasas de infección entre el 0,5% hasta 1,28% (160,166) y de 0,89 en *A. aureolatum* (161). Para *A. mixtum* se reportan tasas del 20,7% (26) y en *A. patinoi* del 6,6% (25).

Trabajos experimentales realizados con *A. cajennense* s.l., por Soares *et al.*, 2012, demostraron la transmisión transovarial y transestadial en esta especie y la capacidad de transmitir la bacteria a hospederos susceptibles (cobayos y conejos) y generar la enfermedad. Sin embargo, sólo una parte de las garrapatas de cada estadio adquirieron la infección y menos del 50% de las hembras transmitieron eficientemente la bacteria a su progenie (165).

En *A. aureolatum* Labruna *et al.*, 2011, observaron eficiencia del 100% en la perpetuación transestadial en los 3 estadios y transmisión transovárica, sin embargo, se reportaron bajas tasas de reproducción y sobrevivencia de las garrapatas al ser infectadas (164).

En *A. tonelliae*, Tarragona *et al* 2016, demostraron que todos los estadios de esta especie tienen la capacidad de infectarse con *R. rickettsii* y mantenerla transestadial y transovarialmente (169).

Estudios de infección experimental con *Rh. sanguineus*, por el contrario han demostrado la susceptibilidad de esta especie de infectarse con *R. rickettsii* cepa *Taiacu* en condiciones de laboratorio y a pesar de no ser efectiva la transmisión transovarial, si se observa perpetuación transestadial (170).

En todos los casos se ha demostrado que *R. rickettsii* en alguna medida afecta el índice reproductivo de la garrapata y por tanto estas especies por si solas no son capaces de mantener la bacteria por sucesivas generaciones, por lo cual se requiere de hospederos amplificadores para garantizar su mantenimiento en la naturaleza.

2.8. Garrapatas y sistema inmune

Las garrapatas durante su proceso de alimentación adquieren diferentes patógenos como *R. rickettsii* que ingresan por medio de la sangre ingerida. El patógeno al interactuar con el vector se replica en espacios intra o extracelulares, como intestino, hemolinfa, glándulas salivales u ovarios (171). El éxito de replicación depende de la capacidad del patógeno de superar las barreras de los órganos del artrópodo, especialmente en el intestino por ser la primer barrera en la infección (171,172).

Luego de infectar el intestino donde ocurre el primer ciclo de replicación del patógeno, estos son transmitidos por medio de la hemolinfa a los ovarios o a las glándulas salivales (o ambos dependiendo del microorganismo). Los que alcanzan a sobrevivir en las glándulas salivales son transmitidos a otros hospederos en el siguiente ciclo de alimentación y los que sobreviven en los ovarios pueden transmitirse transováricamente a su progenie (172)

De acuerdo con lo publicado por Hajdušek *et al.*, 2013, en las garrapatas las moléculas y los mecanismos inmunes constituyen barreras para la transmisión de patógenos, proponen

además que en los diferentes órganos de estos artrópodos existen moléculas como péptidos antimicrobianos tipo defensinas, microplusinas, lisozimas, distribuidas en glándula salival, ovario, intestino y hemolinfa (172) así como mecanismos del sistema del complemento, fagocitosis, encapsulación entre otros (172,173).

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son efectores importantes del sistema inmunológico de invertebrados y vertebrados, que tienen un amplio espectro de actividad contra microorganismos (174). En garrapatas, los principales sitios de expresión de PAM son hemocitos, grasa corporal, intestino, ovarios y glándulas salivales, donde pueden modularse en respuesta a la alimentación de sangre o a la presencia de un agente microbiano (175). Varias revisiones de los PAM de garrapatas que abordan su caracterización, así como su interacción con microorganismos se han publicado en la última década (172,176,177).

El sistema inmunológico de las garrapatas, así como en otros artrópodos, es integrado, versátil y posiblemente capaz de hacer una red de conexiones entre vías de señalización, fortaleciendo así la respuesta eficaz antimicrobiana (173). En la búsqueda de esclarecer este tipo de mecanismos, se han empleado diversas metodologías como los análisis de RNAseq, qPCR entre otras, que han establecido tanto la regulación como la no regulación de genes del sistema inmune en garrapatas bajo condiciones de laboratorio en infecciones por diversos microorganismos, entre ellos *R. rickettsii* (13,178,179).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la rickettsiosis transmitida por garrapatas en zonas rurales del departamento del Cauca y la importancia de *A. patinoi* en la epidemiología de la enfermedad.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la seropositividad y los factores asociados a la rickettsiosis transmitida por garrapatas en humanos provenientes de zonas rurales del departamento del Cauca.
2. Determinar la seropositividad de rickettsiosis transmitida por garrapatas en animales domésticos de zonas rurales del departamento del Cauca.
3. Identificar las especies de *Rickettsia*, presentes en garrapatas recolectadas de animales domésticos de zonas rurales del departamento del Cauca.
4. Identificar la frecuencia de rickettsiosis en pacientes sintomáticos febriles de una zona priorizada del departamento del Cauca.
5. Evaluar la Competencia Vectorial de *Amblyomma patinoi* infectada con *Rickettsia rickettsii* en condiciones de laboratorio
6. Realizar una aproximación del efecto de la infección de *Rickettsia rickettsii* sobre la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en *Amblyomma patinoi* infectada en condiciones de laboratorio.

4. METODOLOGÍA

4.1 Área geográfica de estudio

El departamento del Cauca se encuentra ubicado entre las cordilleras central y occidental en las regiones Andina y Pacífica. Su localización geográfica está a los 00°58'54" / 03°19'04" latitud norte y 75°47'36" / 77°57'05" longitud oeste. Cuenta con una superficie de 29.308 km² compuesta principalmente por selva y llanura. El relieve del territorio pertenece al sistema andino distinguiéndose a nivel macro siete unidades morfológicas: la llanura del Pacífico,

cordillera Occidental; cordillera Central, altiplano de Popayán, Macizo Colombiano, Valle del Patía y el sector de la cuenca del Amazonas. Por la geografía de la región se presentan variaciones en el clima representadas en los pisos térmicos cálido, templado y frío y los pisos bioclimáticos subandino, altoandino y páramo. Limita al Norte con el departamento del Valle del Cauca, por el Este con los departamentos de Tolima, Huila y Caquetá, por el Sur con Nariño y Putumayo y por el Oeste con el océano Pacífico. Tiene una población de 1.243.503 habitantes según datos del DANE 2018 (180) y cuenta con una gran diversidad étnica que comprende población indígena, negra, mulata o afrocolombiana, de alrededor del 43% (181).

El departamento del Cauca está dividido en 38 municipios, 99 corregimientos, 474 inspecciones de policía, así como numerosos caseríos y sitios poblados. La economía está basada principalmente en la producción agrícola y ganadera, la explotación forestal, la actividad pesquera y el comercio. (182,183)

El estudio fue realizado en ocho zonas rurales pertenecientes a 4 municipios del departamento de Cauca, ver Tabla 1 y Figura 1. La selección de las zonas rurales se realizó teniendo en cuenta: Reporte de presencia de garrapatas en animales, antecedentes de picadura de garrapatas en humanos, facilidad de acceso por carretera y sitios sin problemas de orden público en las fechas de ejecución del proyecto. Esta información fue suministrada por el área de Zoonosis de la Secretaría Departamental de Salud del Cauca, técnicos de saneamientos y auxiliares de enfermería de cada zona.

Las condiciones geográficas de las zonas rurales donde se realizó el estudio se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones geográficas zonas rurales

Municipio	Vereda	Coordenadas geográficas	Altitud (metros)	Temperatura promedio
La Sierra	Juana	N 2°14'23.022" / O 76° 54' 1.139"N	773	20°C
	Castaña	2°14' 22.212" / O 76° 53'52.835"	755	
El Tambo	El Zarzal	N 2°27' 18.226" / O 76° 43'54.571"	1677	20°C
	El Placer	N 2°25' 4.381" / O 76° 46'53.959"	1789	
	Betania	N 2°28' 41.673" / O 76° 48'36.351"	1723	
Santander de	Lomitas	N 3°2' 15.223" / O 76° 34'37.983"	1024	26°C
	Arriba	N 3°3' 39.535" / O 76° 33'41.36"	991	
Quilichao	Lomitas	N 3°4' 28.979" / O 76° 33'23.671"	985	18°C
	Abajo	N 3°5' 19.195" / O 76° 33' 24.057"	976	
Caloto	El Credo	N 3° 2' 1.45" / O 76°17' 57865"	1606	18°C
	Huellas	N 2°59' 35.156" / O 76°22'46.918"	1723	



Figura 1. Ubicación geográfica departamento del Cauca

Fuente: Autor

4.2 Población y muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia en cada una de las veredas incluidas en el estudio: Juana Castaña del municipio de La Sierra; Zarzal, Placer y Betania en el municipio del Tambo; Lomitas arriba y lomitas abajo en Santander de Quilichao, y las veredas el Credo y Huellas, del resguardo indígena de Huellas en el municipio de Caloto. El muestreo fue realizado entre agosto a noviembre del 2017.

Para la colecta de las muestras se realizó una visita casa a casa en todas las veredas, donde se explicó el objetivo del estudio; las personas mayores de 18 años que aceptaron participar voluntariamente firmaron el consentimiento informado (Anexo 1), se diligenció la encuesta de datos demográficos (Anexo 2) y se recolectaron las muestras de sangre (en un tubo seco y en otro con anticoagulante) de cada participante. Se excluyeron menores de 18 años, residentes no habituales y visitantes.

Al mismo tiempo, también se colectó información básica (nombre, especie, raza, sexo, edad, peso) sobre animales domésticos (perros, caballos y vacas) que se encontraban en las viviendas. Posterior a la firma del consentimiento (Anexo 3) por parte de cada dueño y con ayuda de los médicos veterinarios del proyecto, se inmovilizaron estos animales por aproximadamente 10 minutos, se les realizó un examen físico con el fin de recolectar el mayor número de garrapatas, y posteriormente se recolectaron muestras de sangre (en un tubo seco y en otro con anticoagulante).

4.3 Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en humanos y animales.

Las muestras de sangre recolectadas tanto de humanos como de animales fueron identificadas y rotuladas con un código asignado por el proyecto, posteriormente se centrifugaron con el fin de separar suero y fueron refrigeradas y transportadas conservando la cadena de frío hasta el Laboratorio de Bacteriología Especial de la Pontificia Universidad Javeriana, donde se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento

Para la detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en muestras de suero de humanos se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

utilizando láminas antigenadas con *R. rickettsii* cepa *Sheila Smith*, siguiendo el protocolo estandarizado del Laboratorio de Bacteriología Especial (Anexo 4). Para esto se realizaron diluciones seriadas base 2 iniciando en 1:64 y se finalizó en la última dilución en la cual se observó fluorescencia, esto con el fin de establecer el título del anticuerpo, teniendo en cuenta como resultado positivo (punto de corte) una dilución $\geq 1:64$.

El conjugado utilizado fue Alexa Fluor® 488- conjugated AffiniPure Fragment Monkey Anti-Human IgG, en una dilución de 1:400. Como controles positivos y negativos se utilizaron muestras de suero humanos (positivas y negativas) obtenidas y testadas en un estudio previo realizado en el Cauca (34).

Para identificar los anticuerpos en muestras de sueros de perros y caballos se utilizaron láminas antigenadas con la cepa *R. amblyommatis*, siguiendo el procedimiento anteriormente escrito, teniendo como punto de corte la dilución 1:64 y realizando diluciones seriadas hasta el título en el cual se observó fluorescencia. Los conjugados usados fueron: Alexa Fluor® 488- conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Dog IgG, dilución 1:800 para perros, y Alexa Fluor® 488- conjugated AffiniPure Goat Anti-Horse IgG, dilución 1:800, para caballos.

4.3.1 Cálculo de factores asociados

Teniendo en cuenta estudios previos realizados con enfermedades transmitidas por garrapatas, sus posibles factores asociados y con el ánimo de explorar otras variables que pudiesen hacer parte importante en la epidemiología de la rickettsiosis, se seleccionaron las siguientes variables en este estudio:

Ocupación: agricultor, ama de casa; Género: mujer, hombre; Tiempo de permanencia en la vivienda: menor a 1 año, entre 1 y 5 años, entre 5 y 10 años, mayor a 10 años; Edad: jóvenes (de 18 a 26 años), adultos (de 27 a 59 años), persona mayor (mayores de 60 años); Material de fabricación de paredes: bareque, cemento, esterilla, ladrillo; Material de fabricación de piso: tierra, madera, cemento, cerámica; Presencia de fiebre último año; Animales en predio; Ratas, chuchas o zarigüeyas cerca de la casa; Garrapatas en la casa al momento de la visita; Garrapatas en los animales al momento de la visita; Problemas de garrapatas en algún momento en el predio; Picadura por garrapatas; Tenencia de perros, caballos o vacas en el predio

Para calcular los factores asociados a la presencia de anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en humanos, se calculó una razón de prevalencias entre dos grupos (seropositivos y seronegativos), versus las variables incluidas en la encuesta de datos demográficos. En el grupo de “seropositivos” se incluyeron aquellos *positivos para anticuerpos* teniendo como punto de corte la dilución 1:64 y como “seronegativos” aquellos a quienes *no se les detectó anticuerpos*. La razón de prevalencias fue calculada de la siguiente manera:

Se elaboró una tabla de 2 x 2 utilizando la herramienta epidemiológica on-line Working in epidemiology WinEpi® 2006 versión 2.0 (184) y se calculó la prueba de chi-cuadrado y Odds Ratio según el caso y el test exacto de Fisher mediante GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, United States). Para este análisis se tuvo en cuenta: Nivel de confianza del 95%.

Para la interpretación y validación de resultados se tuvo en cuenta los siguientes criterios:

Significancia estadística: Aquellos cuya unidad no estaba incluida en el intervalo de confianza calculado. La herramienta epidemiológica on-line Working in epidemiology WinEpi® 2006 versión 2.0 (184) calcula dos intervalos de confianza, uno por aproximación logarítmica y otro por aproximación basada en la prueba de Chi-cuadrado.

Interpretación de la razón de prevalencias:

Cuando el valor resultante fue menor de 1: el factor al que el individuo estaba expuesto correspondió a un posible factor protector. Cuando el valor resultante fue igual a 1: no existió asociación entre la enfermedad y la exposición al factor. Cuando el valor resultante fue mayor de 1: el factor al que el individuo estuvo expuesto correspondió a un posible factor de riesgo.

En el test exacto de Fisher se tuvo en cuenta la significancia estadística verificada por el un valor $P \leq 0.05$.

4.4 Identificación de especies de Rickettsia, presentes en garrapatas recolectadas de animales domésticos

La metodología de este objetivo se puede encontrar en la siguiente publicación:

Heidy-Carolina Martínez Díaz, Juliana Gil-Mora, Paola Betancourt-Ruiz, Carlos Ramiro Silva-Ramos, J. Manuel Matiz-González, María-Alejandra Villalba-Perez, María Catalina Ospina-Pinto, Alejandro Ramirez-Hernández, Luz-Adriana Olaya-M, Eliana Bolaños, Claudia Cuervo, Efraín Benavides, Marylin Hidalgo. Molecular detection of tick-borne rickettsial pathogens in ticks collected from domestic animals from Cauca, Colombia, Acta Tropica, Volume 238, 2023,

4.4.1 Organización de pooles y clasificación taxonómica de garrapatas.

Las garrapatas recolectadas (en aproximadamente 10 minutos) sobre los animales domésticos (perros, caballos y vacas) fueron conservadas en etanol al 70% y transportadas al Laboratorio. Posteriormente las garrapatas fueron lavadas con etanol al 70% y separadas por estadio, especie de animal y municipio para realizar su respectiva clasificación taxonómica siguiendo diferentes claves de referencia (94,186,187). Luego, fueron separadas por pooles (grupos) en viales de 1,5 ml teniendo en cuenta la especie de garrapata identificada, el estadio de vida, municipio y animal sobre el cual se recolectó. La separación de pooles fue realizada de la siguiente forma: los machos de 6 a 7 especímenes por vial; las hembras de acuerdo con su tamaño de a ½, 1 o 2, las ninfas de a 8 a 9 y las larvas de 16 a 17 dependiendo el caso. Todos los viales fueron debidamente marcados y conservados hasta su procesamiento.

4.4.2 Extracción y cuantificación de DNA

Luego de la obtención de los pooles, se descartó cuidadosamente el etanol de cada vial y para garantizar la evaporación de este y evitar interferencias en el proceso, se calentó cada uno a 70°C por aproximadamente 15 a 20 minutos, luego se procedió a macerar con punta plástica sellada, se agregó 40 µl de PBS 1X y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Para la extracción del DNA, se utilizó el estuche comercial Qiagen (DNeasy Blood and Tissue; QIAGEN Inc., Valencia, CA), siguiendo las indicaciones del fabricante, el cual tuvo una modificación en la primera parte que consistió en reemplazar el buffer ATL y la proteinasa K por DNAzol® (188). El DNA obtenido fue almacenado en crioviales de 1.5 ml y conservado a -20°C hasta su amplificación. Como controles de extracción, se utilizó un tubo adicional sin macerado de garrapatas, con el cual se realizó todo el procedimiento. La cuantificación del DNA se realizó con espectrofotómetro Nano Genius verificando su concentración en ng/µL y su calidad (relación 260/280 entre 1,8 y 2).

Para verificar la calidad del DNA y la ausencia de inhibidores, se realizó la amplificación del gen *β-actina* (189) proteína altamente conservada en eucariotas, por PCR convencional (cPCR), utilizando los iniciadores Actin-FWD y Actin-REV (Tabla 2)

4.4.3 Identificación molecular de garrapatas

Posterior a la identificación morfológica de las garrapatas, se realizó la amplificación por PCR convencional de los genes mitocondriales 16S-rRNA y *COI-1* de 460pb y 700pb respectivamente y el nuclear *ITS-2* de 1000pb (Tabla 2) para la confirmación molecular de *A. cajennense* s.l. en los estadios inmaduros.

Para las demás especies identificadas morfológicamente como *D. nitens*, *Rh. sanguineus* s.l. y *Rh. microplus*, se amplificó solamente gen 16S-rRNA. Posterior a la obtención de productos amplificados estos fueron revelados en gel de agarosa al 2% coloreada con SYBR safe (Invitrogen), corridos a 100V por 40min y visualizados en un transiluminador. Se utilizó como control negativo agua libre de RNAsas y como control positivo DNA extraído de un espécimen adulto de *A. mixtum*.

Luego, se enviaron a secuenciar por la metodología de Sanger los productos para confirmación de especie, seleccionados de la siguiente manera: de *A. cajennense*, todos los productos de los estadios inmaduros y para las demás especies se seleccionaron al azar pools de todos los estadios.

Posteriormente, se realizó el análisis de las secuencias con el software libre Bioedit, V7.0.5.3, (190) y se utilizó la herramienta BLAST para compararlas con secuencias referencia depositadas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Luego, se realizó alineamiento de todas las secuencias obtenidas en este estudio junto con otras de referencia, separadas por genes y especie para realizar los árboles filogenéticos empleando el programa MEGA X (191), con el método de maximum likelihood (ML) y un bootstrap de 1000 réplicas. El modelo con el cual se realizó cada árbol fue calculado por el software teniendo en cuenta cada gen. Para el gen 16S-rRNA de todas las especies, se utilizó el modelo Tamura-3-parámetros (192), para *COI-1* el modelo TGR (tiempo general reversible) (193) y para el gen *ITS-2* el modelo kimura 2 parámetros (194).

En los árboles de *Amblyomma* se incluyeron todas las secuencias. Para *Dermacentor* y *Rhipicephalus* se realizó una matriz de identidad y se seleccionaron así: Las secuencias con una identidad del 100%, se escogieron al azar entre 2 y 3 con el fin de no saturar el árbol y las que presentaron una identidad menor del 99%, se eligieron todas para poder evidenciar de forma adecuada las posibles diferencias de filogenia presentadas.

Tabla 2. Iniciadores para la identificación molecular de garrapatas

Iniciadores	Gene	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicon (bp)	Ref
16S F	16S- rRNA	5' -CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3	460	(195)
16S R		5'-GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT3'		
LCO1490 (F)	COI-1	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	700	(196)
HCO2198 (R)		5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3		
ITS2 (F)	ITS-2	5'-CCATCGATGTGAAYTGCAGGACA-3'	1000	(197)
MCLN (R)		5'-GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGT-3'		

4.4.4 Detección molecular de genes de *Rickettsia*

Todos los genes fueron detectados mediante PCR convencional. Luego de la amplificación del gen β -actina, a todas las muestras positivas, se les realizó un tamizaje con el gen rickettsial *htrA* (199) el cual codifica para una proteína de 17kDa y es conservado entre miembros de las rickettsias de las fiebres manchadas y del grupo del tifus. Posteriormente los pools que fueron positivos a este gen, se les amplificó los genes (*gltA* y *sca5*) (200,201). Como controles positivos se utilizó DNA de *Rickettsia vini* y como control negativo agua libre de nucleasas. Las muestras que amplificaron por lo menos para dos genes de los testados (*gltA*, *sca5*, *htrA*), fueron considerados positivos para *Rickettsia* sp.

La secuencia de los iniciadores, el tamaño del producto esperado y las condiciones de la PCR están descritas en la Tabla 3. Para esto se utilizó la enzima GoTaq Green MasterMix® (Promega). Los productos amplificados fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seakean, Lonza, USA) preparado con tampón 1X Tris Borato EDTA® (TBE). Se utilizó SYBR®safe como agente intercalante (Invitrogen™, Life Technologies Corp., Grand Island, NY), y para la visualización de las bandas en el gel, se utilizó el fotodocumentador (Gel Doc™ XR + Gel Documentation System, BIO RAD).

Tabla 3. Iniciadores para la detección de genes de *Rickettsia* sp.

Iniciadores	Gene	Secuencia (5'- 3')	Tamaño del amplicon (bp)	Ref
Actin-FWD	β -	CGGAACCGCTCATTGCC	289	(189
Actin-REV	<i>Actin</i>	GCTCACTCAGTGTGGCAAAG)
CS-78	<i>gltA</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	(200
CS-323		GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAG GAT)
120-3599	<i>sca5</i>	TACTTCCGGTTACAGCAAAGT	816	(201
120-2788		AAACAATAATCAAGGTAAGT)
17 kD1	<i>htrA</i>	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	434	(199
17 kD2		CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG)

Tabla 4. Condiciones de las PCRs

	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
<i>β-actina</i> (189)	95°C	4 minutos	1 ciclo
	94°C	30 segundos	
	57°C	30 segundos	35 ciclos
	72°C	60 segundos	
	72°C	5 minutos	1 ciclo
<i>gltA</i> (200)	95°C	3 minutos	1 ciclo
	95°C	15 segundos	
	48°C	30 segundos	40 ciclos
	72°C	30 segundos	
	72°C	7 minutos	1 ciclo
<i>sca5</i> (201)	95°C	3 minutos	1 ciclo
	95°C	30 segundos	
	52°C	30 segundos	40 ciclos
	72°C	90 segundos	
	72°C	7 minutos	1 ciclo
<i>htrA</i> (199)	94°C	30 segundos	40 ciclos
	57°C	2 minutos	
	70°C	2 minutos	

Para la secuenciación solamente se procesaron cinco muestras positivas para el gen *sca5*, ya que, luego de screening inicial no fue posible obtener amplificación de este gen ni de los otros en las demás muestras. Para esto se purificaron los productos amplificados con el estuche comercial Wizard® para purificación de DNA genómico. Posteriormente se enviaron a

secuenciar. Los amplicones obtenidos fueron editados con el Software libre BioEdit (Sequence Alignment Editor v 7.0.5.3) (190) teniendo en cuenta las bases con un phred score > 20, alineadas usando el Software Clustal W (202) y luego comparadas con secuencias de referencia disponibles en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

El árbol filogenético fue construido con el Software MEGAX (191), usando el método Maximum Likelihood basado en el modelo Tamura-3-parámetros (192).

Finalmente la frecuencia de garrapatas infectadas con especies de *Rickettsia* fue expresada como tasa de infección mínima (MIR siglas en inglés) (203), y fue calculada como el total de pooles positivos dividido en el número total de garrapatas recolectadas de la misma especie, multiplicado por 100:

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

El MIR hace referencia a que por cada pool positivo existe por lo menos un espécimen infectado con *Rickettsia* sp. (204).

4.5 Identificación de la frecuencia de rickettsiosis en pacientes sintomáticos febriles de una zona priorizada del departamento del Cauca

Para desarrollar del presente objetivo se propuso realizar un estudio de vigilancia centinela, el cual consistió en captar a todos los pacientes sintomáticos febriles que acudieron a un centro de salud de una población priorizada del departamento del Cauca durante un periodo de 3 meses.

4.5.1. Selección del centro de salud

Para la selección del centro de salud donde se adelantó el estudio de vigilancia centinela se tuvo en cuenta los siguientes criterios: Seropositividad obtenida en el objetivo 1, municipio con

el más alto reporte de síndrome febriles no especificados, facilidad de acceso por vía terrestre, sitios sin problemas de orden público.

4.5.2 Desarrollo del estudio de vigilancia centinela

Durante el periodo comprendido entre marzo a mayo del 2019, se concentró el estudio en el hospital Francisco de Paula Santander (HFPS) del Municipio de Santander de Quilichao, específicamente en el área de urgencias. En este se tuvieron en cuenta todos los pacientes que llegaron al centro de salud con temperatura corporal superior a 37,5°C y los cuales cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: mayores de 18 años, que residieran en zona urbana o rural del municipio de Santander de Quilichao, que trabajaran en zona rural o que tuviesen antecedentes de contacto reciente con animales infestados con garrapatas, adicional a esto que presentaran sintomatología consistente con dolor de cabeza, malestar general y dolor articular.

A todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (previamente mencionados), que aceptaron participar voluntariamente, que firmaron el consentimiento informado (Anexo 1), y diligenciaron la encuesta de datos demográficos (Anexo 2), se les recolectó la primera muestra de sangre en el momento de la consulta en el centro de salud y posteriormente, pasados 15 días se les recolectó una segunda muestra en su domicilio.

A estas muestras se les realizó los siguientes analitos: Hemograma en el laboratorio Clínico del mismo hospital (HFPS); Transaminasas ALT y AST, fosfatasa alcalina (FALK), en el Hospital San Ignacio (Bogotá); y en el Laboratorio de Pontificia Universidad Javeriana: Proteína C reactiva, mediante la prueba de aglutinación en Latex de Winer Lab®; Prueba rápida para Dengue, utilizando el estuche ad-bio® Dengue IgG/IgM, una prueba de inmunoensayo de flujo lateral utilizado para la detección simultánea de anticuerpos IgG e IgM; Elisa IgM para *Leptospira* marca Abbott® e IFI para *R. rickettsii* y *R. typhi* del estuche comercial Focus® Diagnostic, esta última teniendo como punto de corte una dilución de 1:64, y como seroconversión una diferencia \geq a 4 títulos o \geq 2 veces la dilución, entre la muestra de fase aguda y fase convaleciente.

4.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos tanto de animales como de humanos fueron anonimizados y procesados en el programa Excel Microsoft Office. Para el análisis descriptivo, se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión. Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar si seguían una distribución normal, y, como mediana e intervalo intercuartílico (RIC), si no lo hacían. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes.

Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité de Investigación y Ética de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana en sesión ordinaria de mayo del 2016.

4.7 Evaluar la Competencia Vectorial de *Amblyomma patinoi* infectada con *Rickettsia rickettsii* en condiciones de laboratorio

La metodología de este objetivo se puede encontrar detalladamente en la publicación.

Martínez-Díaz HC, Forero-Becerra E, Hidalgo M, Labruna MB. Experimental infection and vector competence of Amblyomma patinoi, a member of the Amblyomma cajennense species complex, for the human pathogen Rickettsia rickettsii. Ticks Tick Borne Dis. 2021

Sep;12(5):101751. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101751. Epub 2021 May 29. PMID: 34130146.

(Anexo 5)

Resumen de la metodología

Para evaluar la competencia vectorial de *A. patinoi*, se recolectaron seis garrapatas hembra completamente alimentadas en vacas de una zona rural del municipio de Villeta Cundinamarca y se incubaron a 25°C y 95% de humedad relativa hasta la generación de larvas F1. Se realizó qPCR del gen rickettsial *gltA* tanto de las hembras como de los huevos con el fin de comprobar que estos no estaban infectados con ninguna especie de *Rickettsia*.

La progenie completa de larvas F1, de cada una de las 6 garrapatas recolectadas, fueron alimentadas por separado sobre los 6 cobayos seleccionados, tres para conformar el grupo control (C1, C2 y C3), y los tres restantes para el grupo infectado (I1, I2, I3).

Para el grupo infectado los cobayos seleccionados fueron inoculados intraperitonealmente con un filtrado de órganos macerados extraídos de un cobayo previamente infectado y el cual desarrolló toda la sintomatología asociada a rickettsiosis además la qPCR de bazo e hígado fue positivo al gen rickettsial *gltA*. Posterior a la inoculación se pusieron a alimentar las larvas F1 sobre estos.

Durante el tiempo de alimentación de las larvas F1 se evaluó sintomatología clínica, temperatura rectal, signos clínicos y periodo de alimentación de las garrapatas. Luego de completar el periodo de alimentación, las larvas se desprendieron y fueron recolectadas y puestas a incubar bajo las mismas condiciones mencionadas previamente hasta su eclosión. Luego se realizó el mismo procedimiento con las ninfas, adultos y larvas F2, conservando los mismos grupos tanto control como infectado.

Los parámetros evaluados en cada ensayo fueron temperatura, signos clínicos de los cobayos, tiempo de alimentación de las garrapatas, porcentaje de infección, éxito de muda, eficiencia en la conversión de huevos a larvas, porcentaje de eclosión, tasa de infección transovarial y tasa de infección filial.

4.8 Estudiar la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en *Amblyomma patinoi* infectada con *Rickettsia rickettsii* en condiciones de laboratorio.

4.8.1 Estandarización.

Para la estandarización, inicialmente es necesario tener un gen normalizador o Housekeeping para luego realizar los ensayos de expresión génica.

El gen normalizador o Housekeeping ensayado, fue el que codifica para la proteína Ribosomal S3A validado previamente tanto en *A. sculptum* como en *A. aureolatum* (Tabla 5)

Para iniciar los ensayos se recolectaron cinco ninfas alimentadas de *A. patinoi* provenientes de vacas de una zona rural de Villeta (Cundinamarca) y se incubaron a 25°C y 95% de humedad relativa hasta su muda. Tres adultos resultantes fueron alimentados sobre un conejo y se retiraron manualmente a los 3 días y los otros dos se procesaron sin alimentar. Todos los especímenes fueron conservados en RNAlater hasta su procesamiento. Después de recolectar las garrapatas, se le hizo seguimiento al conejo por 21 días y se realizó IFI con láminas antigenadas con *R. rickettsii* cepa Taiacu para la detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas

4.8.1.1. Procesamiento

Los adultos completos de *A. patinoi* fueron macerados para la extracción simultáneamente de DNA y RNA con el estuche comercial blackPREP Tick DNA/RNA Kit - Analytic jena^(R), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA fue almacenado a -20°C y el RNA a -80°C hasta su procesamiento.

Luego de obtener el material genético se realizó la cuantificación de DNA y de RNA, se seleccionaron las tres muestras con mayor concentración y se procedió a realizar la síntesis de cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV Invitrogen®, siguiendo el protocolo Anexo 6.

4.8.1.2. Selección de secuencias codificantes de DNA (CDS).

Con el cDNA de *A. patinoi* obtenido, se realizó qPCR por triplicado del gen que codifica para la proteína Ribosomal S3A tanto en *A. sculptum* como en *A. aureolatum* siguiendo las recomendaciones de Martins y colaboradores (13,178,179).

Luego de elegir el gen normalizador en las muestras de *A. patinoi* se procedió a evaluar un grupo de 25 secuencias publicadas previamente en estudios proteómicos, como CDSs diferencialmente expresados tras la infección con *R. rickettsii* en glándula salival e intestino de *A. sculptum* y *A. aureolatum* (13,178,179), con el fin de establecer cuáles estaban presentes en *A. patinoi*.

Aquellas CDS que se lograron amplificar y que tuvieron un Ct menor a 36 fueron seleccionadas para realizar las curvas estándar; para esto el cDNA obtenido se ajustó a una concentración de 200ng y se realizaron diluciones seriadas base 2, con el fin establecer la concentración ideal de las muestras para los ensayos.

Tabla 5. CDSs utilizadas en el proceso de estandarización

	CDS	Anotación	Oligonucleotide sense	Oligonucleotide antisense
1	Ambaur-60175-15	Cytochrome P450	GGAAAAGACTTG CATCCCA A	AAGAGCCAAAGCAGGTTT CA

2	Ambaur-60175-33	Cytochrome P450	GCTGTGGTGAAGAGCCAAA	ACCGCTGGTGGGTAAAGT C
3	AmbarSigP-5190	α -Macroglobulin	CCGAATACTGCTGCTTGACA	GATGAACTGCTGCTGGAA CA
4	Ambaur-69859	Microplusin	GGAGCTATGCAAGAAGACC G	CCTTCGCACATCTTACGGA T
5	AmbarSigP-22173	Microplusin	GAGTTTAACACCCGCTTGG A	TTCCGCAGAAAGGTCACTT C
6	Ambaur-19862-23	5,3 kDa antibacterial peptide	GAAAAGCTGCGACACCAAA	CTACGCAGCGTGTGCATC
7	Ambaur-19862-35	5,3 kDa antibacterial peptide	AGCTGCGACACCAAACAAC	CTACGCAGCGTGTGCATC
8	AmbarSigP-47654-27	Lipocalin	TGCGAGCGAGACATCAGA	TTCATCAAAGCCCAGGACA
9	AmbarSigP-47654-18	Lipocalin	AGAGGGCCCACTAGAGGAA G	TGTCACCCAGGTACGTTTC A
10	Ambaur-47378	Basic tail protein	GTCCAGGTGTTCTTCTGA	TTGCACTTCTTGGGCTTCT T
11	AmbarSigP-70152	Basic tail protein	GCTTCTTCAATACGCCGAAG	TAAGGTGTCGTAGGGGAT GC
12	Ambaur-6577	8.9kDa protein	GCTGCACTTGTATATGCGG A	CTTTACGGAGCACCACCAT T
13	Ambaur-54200	Secreted protein	ATGCCGTGCAACACAGAAT A	ACACTCCAAGTGTGGGGA AG
14	Ambaur-4333	Salivary secreted protein of 21.3 kDa	GCTATCACCACTGTCGCTCA	GCGTAGGTGGTGTGAACC TT
15	Ambaur-45342	Lysozyme	AATGGCAGTACGGACTACG G	GCAGAGCTGAACAGGAAA CC
16	Ambaur-25926	Evasin	ATTGGGCCCGTTACAGT	TCCACGCATTTCTTTCTG
17	AcajSigP-85359	Peritrophin	GTCGTGAGCCTTTCCTTCAT	GCAAAGGTAGAACGTGGA GC
18	Acaj-48379-36	Tick defensin	TCAGAGTCCGCCATAGCC	AGCAAGCCGCCACAATAG
19	Acaj-48379-41	Tick defensin	GGTGCCCGTTTCAGAACATA	GCTCTTGCAGATGCAGGT C
20	Acaj-48379-29	Tick defensin	TGCCCGTTCAGAACATATCA	TCTTGCAGATGCAGGTCTT A
21	Acaj-74395-37	Antimicrobial peptide	GAAGGTCCTGGCTGTTGC	GCGGACTCTGACGAGAGG
22	Acaj-74395-35	Antimicrobial peptide	ATTTTTGTTCTCGTCGCTGG	GAAGCTACCGCCACAATA GC
23	Acaj-60304	Peptidoglycan recognition protein	AGTGGGTGCCCACTAAA G	CGATCTGATCTTGCCATT T
24	AcajSigP-6765	ML domain protein	GAACTATTCGGCGTGATGC T	AACTGTGCCGAGCTTTTCA T
25	AcajSigP-79349	Glycolate oxidase	TACCTGCTGCGAATGTTCTG	TTCTTCTGATGAGGCGAA
26	S3A As	Proteína Ribosomal S3A		C

4.8.2 Análisis de expresión

Para el análisis de expresión se utilizaron dos grupos de garrapatas; un grupo infectado con *R. rickettsii* y un grupo control (no infectado) y se realizaron los ensayos con larvas y ninfas completas y de los adultos solamente se realizaron en intestino y glándula salival como sigue a continuación.

4.8.2.1 Selección de las muestras

Larvas

Para el grupo control, se seleccionaron al azar larvas no infectadas completamente alimentadas en cobayos (*Cavia porcellus*). A un grupo de 20 especímenes se les realizó detección individual del gen rickettsial *gltA* para confirmar que no estuviesen infectadas y otro grupo de 75 especímenes fueron agrupados en 15 pooles de 5 individuos cada uno.

Para el grupo infectado, se recolectaron 75 larvas completamente alimentadas en cobayos (*Cavia porcellus*) inoculados intraperitonealmente con un filtrado de órganos infectados con *R. rickettsii*, las cuales fueron obtenidas luego del tercer día de inicio de fiebre y se agruparon en 15 pooles. Estos especímenes fueron conservados en RNAlater hasta su procesamiento.

Se realizó extracción de DNA/RNA, con el estuche comercial blackPREP Tick DNA/RNA Kit - Analytic jena^(R), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA fue almacenado a -20°C y el RNA a -80°C hasta su procesamiento.

Cuantificación del gen rickettsial *gltA*

A los 15 pooles obtenidos del grupo infectado se les realizó la cuantificación de DNA/RNA. El DNA fue usado para cuantificar la cantidad de *Rickettsia* por qPCR usando una sonda fluorogénica del gen rickettsial citrato sintasa (*gltA*) (200) como se describe en Martins et al (13,16,178,179). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Síntesis del cDNA

Para la síntesis de cDNA se seleccionaron del grupo control cinco pools con mayor concentración de RNA y del grupo infectado los cinco que tenían mayor concentración de bacteria (evaluada en el ítem anterior) y se ajustó a una concentración final de 500ng

Ninfas.

La selección de las ninfas fue realizada de la misma forma que las larvas, conservando los mismos grupos (infectado y control). Se seleccionaron ninfas completamente alimentadas en cobayos (*Cavia porcellus*) y se procesaron individualmente, no en pools.

Los ensayos de qPCR, la cuantificación del gen rickettsial *gltA* y los criterios de selección para la síntesis de cDNA, fue realizada siguiendo el mismo procedimiento empleado con larvas. Todos los ensayos de qPCR fueron realizados por triplicado.

Obtención de intestino y glándula salival de adultos

Selección

Se pusieron 20 parejas de adultos de *A. patinoi* tanto del grupo control como infectado (por separado) en conejos blancos (*Oryctolagus cuniculus*) sanos, se revisaron diariamente y posterior a su fijación se dejaron alimentar por 3 días, luego se retiraron manualmente. Las garrapatas alimentadas se mantuvieron vivas hasta su disección.

Posteriormente los individuos recolectados se pesaron en balanza electrónica, y se eligieron aquellos con pesos (en mg) similares, tanto del grupo control como infectado.

Extracción de intestino (MG) y glándulas salivales (GS)

Se colocaron los especímenes en una lámina de parafina con 3 gotas de PBS 1X, se sujetaron con una pinza entomológica y con ayuda de una lámina de bisturí se cortó la base del capítulo y los extremos del cuerpo con el fin de retirar las patas de ambos lados. Luego se levantó la parte dorsal, con el fin de separar región dorsal de ventral y se extrajeron los órganos de interés. Glándula salival e intestino se lavaron en PBS en la misma lámina y se conservaron

en RNAlater para posterior maceración, extracción DNA/RNA, síntesis de cDNA y procesamiento molecular.

Se separaron la glándula salival (GS) e intestino (MG) de 16 especímenes y se realizó el mismo procedimiento mencionado en el ítem de "larvas". Se extrajo DNA/RNA; del grupo infectado se estableció la concentración de *Rickettsia* mediante la cuantificación del gen rickettsial *gltA* y se seleccionaron 6 muestras de MG y GS tanto del grupo control como infectado.

4.8.3. Cálculo de expresión relativa

Las muestras de cDNA de larvas, ninfas, intestino y glándula salival se procesaron por qPCR utilizando el equipo StepOnePlus™ (ThermoFisher Scientific), usando MasterMix SYBR Green/ROX (ThermoFisher Scientific) y los CDSs seleccionados en la estandarización, siguiendo el protocolo descrito a continuación: 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (seg), 60°C por 60 seg, and 72°C por 20 seg. Se realizó la curva melting para comprobar la especificidad de los iniciadores y la eficiencia de cada uno fue determinada por medio de las curvas estándar realizadas con diferentes concentraciones de cDNA que iniciaron en 400ng hasta 3.12 ng, siguiendo el procedimiento realizado por Martins *et al* (13,178,179).

Para calcular la expresión relativa de las CDSs se realizó por medio de la ecuación de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (205), teniendo en cuenta los valores obtenidos en la qPCR del grupo control, del grupo infectado y del gen ribosomal de la proteína S3A de *A. sculptum* (13,178,179). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y para validar estadísticamente las diferencias se utilizó el test-t Student's utilizando GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, United States), Los resultados fueron estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Población

Se recolectaron un total de 506 muestras de sangre de humanos, distribuidas de la siguiente manera: 264 (52,2%) en el municipio del Tambo; 152 (30%) en Santander de Quilichao, 50 (9,9%) en Caloto y 40 (7,9%) en La Sierra. El municipio con el mayor número de participantes fue El Tambo y el de menor, La Sierra.

La encuesta demográfica que se aplicó incluyó variables como: edad, género, ocupación, tiempo de permanencia en la vivienda. Características de la vivienda como: material de construcción de pisos, paredes y techos. Antecedentes clínicos recientes, como presencia de fiebre y sarpullido en el año previo a la aplicación de la encuesta. Antecedentes de picadura de garrapata. Presencia de animales en el predio, observación de animales como zarigüeyas alrededor del predio. Presencia de garrapatas en la vivienda o en los animales. Presencia de animales domésticos en el predio: perros, caballos y vacas.

Las características generales de la población y vivienda se resumen en las tablas 6, 7 y 8

Tabla 6. Características generales de la población

Variable	Total	
Sexo mujer, (%)	348/506	68,7%
Mediana para la edad (años)	18-95	47
Ocupación (Ama de casa) (%)	246/506	48,6%
Ocupación (Agricultor) (%)	157/506	31%
Tiempo de permanencia en la zona menor a 1 año (%)	47/506	9,3%
Tiempo de permanencia en la zona entre 1 y 5 años (%)	72/506	14,2%
Tiempo de permanencia en la zona entre 5 a 10 años (%)	64/506	12,6%
Tiempo de permanencia en la zona Mayor a 10 años (%)	319/506	63%
Edad de 18 a 26 años (Jóvenes)	67/506	13,2%
Edad de 27 a 59 años (adultos)	286/506	56,5%
Mayores de 60 años (persona mayor)	153/506	30,2%

Tabla 7. Condiciones de vivienda.

Material de Construcción	Total	Porcentaje
Paredes – Bareque	131/506	25,9%
Paredes – Esterilla	33/506	6,5%
Paredes – Cemento	20/506	3,9%
Paredes - Ladrillo	322/506	63,6%
Piso – Tierra	82/506	16,2%
Piso - Madera	10/506	1,9%
Piso – Cemento	320/506	63,2%
Piso - Cerámica	94/506	18,5%

Tabla 8. Otras características de la población.

Variable	Total	Porcentaje
Presencia de fiebre el último año	163/506	32,2%
Garrapatas en sus animales en el momento de la visita	260/506	51,3%
Garrapatas en sus casas al momento de la visita	63/506	12,4%
Problemas de garrapatas en algún momento en su predio	69/506	13,6%
Picadura por garrapata	128/506	25,3%
Presencia de perros en la vivienda	389/506	76,8%
Presencia de caballos en la vivienda	79/506	15,6%
Presencia de vacas en la vivienda	53/506	10,4%

5.2 Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias transmitidas por garrapatas en humanos

De las 506 muestras de suero recolectadas de humanos se detectaron anticuerpos en 434, para una seropositividad general del 85,7%. Esta fue superior al 83% en todos los municipios, siendo el mayor observado en La Sierra con un 97,5% (39/40) y el menor en El Tambo con el 83,3% (220/264).

En el título 1:128 y 1:256 se mantuvo el mayor porcentaje para La Sierra, con valores del 75% y 70%, respectivamente; y el menor fue observado en Caloto con el 44% (en 1:128) y 40% (en 1:256).

La detección de anticuerpos fue observada hasta el título 1:2048 (3 casos), con un porcentaje del 1%, siendo uno del municipio del El Tambo y los otros dos de Santander de Quilichao. (Ver tabla 9).

Tabla 9. Positividad por dilución de anticuerpos en humanos por vereda y municipio

Municipio	Vereda	Total Participantes	Dilución 1:64	Dilución 1:128	Dilución 1:256	Dilución 1:512	Dilución 1:1024	Dilución 1:2048
La Sierra	Juana Castaña	40	97,5% (39/40)	75% (30/40)	70% (28/40)	22,5% (9/40)	17,5% (7/40)	0% (0/40)
	El Tambo	Zarzal	130	91,5% (119/130)	64,6% (84/130)	60% (78/130)	21,5% (28/130)	18,5% (24/130)
	Placer	88	85,2% (75/88)	48,9% (43/88)	43,2% (38/88)	6,8% (6/88)	1,1% (1/88)	0% (0/88)
	Betania	46	56,5% (26/46)	43,5% (20/46)	43,5% (20/46)	4,3% (2/46)	2,2% (1/46)	2,17% (1/46)
	Total	264	83,3% (220/264)	55,7% (147/264)	51,5% (136/264)	13,6% (36/264)	9,8% (26/264)	0,4% (1/264)
Santander de Quilichao	L. Arriba	68	86,8% (59/68)	55,9% (38/68)	52,9% (36/68)	10,3% (7/68)	1,5% (1/68)	1,5% (1/68)
	L. Abajo	84	88,1% (74/84)	69% (58/84)	63,1% (53/84)	9,5% (8/84)	2,4% (2/84)	1,2% (1/84)
	Total	152	87,5% (133/152)	63,2% (96/152)	58,6% (89/152)	9,9% (15/152)	2% (3/152)	1,3% (2/152)
Caloto	El Credo	37	81,1% (30/37)	40,5% (15/37)	35,1% (13/37)	5,4% (2/37)	2,7% (1/37)	0% (0/37)
	Huellas	13	92,3% (12/13)	53,8% (7/13)	53,8% (7/13)	0% (0/13)	0% (0/13)	0% (0/13)
	Total	50	84% (42/50)	44% (22/50)	40% (20/50)	4% (2/50)	2% (1/50)	0% (0/50)
Total Participantes		506	85,7% (434/506)	58,3% (295/506)	53,9% (273/506)	12,2% (62/506)	7,3% (37/506)	1% (3/506)

5.2.1 Factores asociados

Fueron construidas tablas de 2x2 tomando como grupo de "enfermos" aquellos positivos para anticuerpos y como "sanos" aquellos a quienes no se les detectó anticuerpos. Se realizó el análisis uno a uno utilizando la herramienta epidemiológica on-line Working in Epidemiology WinEpi® 2006 versión 2.0 y se encontró que únicamente la variable "Agricultor" fue un factor asociado (factor de riesgo) a la presencia de anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en humanos, con una razón de prevalencias de 1.09 IC 95% (1.0129 – 1.1781) y un odds ratio de 2.03 IC 95% (1.1084 – 3.7392) siendo estos valores estadísticamente significativos, indicando con esto que las personas cuya ocupación es agricultor, la seropositividad fue 1.09 veces mayor que aquellos que se desempeñan en otras actividades económicas.

En otras palabras, las personas cuya actividad económica es la agricultura presentan mayor probabilidad de presentar anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, que los que se dedican a otra actividad.

Los otros factores asociados no fueron estadísticamente significativos o los valores de los límites no fueron válidos. Los resultados de cada una de las asociaciones se pueden observar en el Anexo 7.

5.3 Detección de anticuerpos IgG contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en animales

5.3.1 Detección de anticuerpos en perros

Se recolectaron en total muestras de suero de 112 perros. En el Tambo y Santander de Quilichao 40 muestras en cada uno, 5 en La Sierra y 27 en Caloto. Se observó una seropositividad general del 80,4%. Los anticuerpos fueron detectados hasta la dilución 1:4096 en el 2,7% (3/112) de las muestras. El municipio con la mayor prevalencia fue El Tambo con el 92,5%, seguido por Caloto con el 77,8%. La menor prevalencia fue observada en La Sierra con el 60%. (Ver tabla 10).

Tabla 10. Positividad por título de anticuerpos en perros por vereda y municipio

Municipio	Vereda	Total muestras	Dilución n 1:64	Dilución n 1:128	Dilución n 1:256	Dilución n 1:512	Dilución n 1:1024	Dilución n 1:2048	Dilución n 1:4096
La Sierra	Juana Castañ	5	60% (3/5)	60% (3/5)	60% (3/5)	60% (3/5)	20% (1/5)	20% (1/5)	20% (1/5)
	Zarzal	14	92,9% (13/14)	78,6% (11/14)	78,6% (11/14)	64,3% (9/14)	7,1% (1/14)	0% (0/14)	0% (0/14)
El Tambo	Placer	17	94,1% (16/17)	58,8% (10/17)	52,9% (9/17)	47,1% (8/17)	0% (0/17)	0% (0/17)	0% (0/17)
	Betania	9	88,9% (8/9)	44,4% (4/9)	44,4% (4/9)	33,3% (3/9)	11,1% (1/9)	11,1% (1/9)	11,1% (1/9)
	Total	40	92,5% (37/40)	62,5% (25/40)	60% (24/40)	50% (20/40)	5% (2/40)	2,5% (1/40)	2,5% (1/40)
Santander de Quilichao	L.Arriba	17	64,7% (11/17)	47,1% (8/17)	41,2% (7/17)	41,2% (7/17)	17,6% (3/17)	5,9% (1/17)	0% (0/17)
	L.Abajo	23	78,3% (18/23)	56,5% (13/23)	56,5% (13/23)	43,5% (10/23)	26,1% (6/23)	4,3% (1/23)	4,3% (1/23)
	Total	40	72,5% (29/40)	52,5% (21/40)	50% (20/40)	42,5% (17/40)	22,5% (9/40)	5% (2/40)	2,5% (1/40)
Caloto	El Credo	19	73,7% (14/19)	36,8% (7/19)	36,8% (7/19)	26,3% (5/19)	5,3% (1/19)	0% (0/19)	0% (0/19)
	Huellas	8	87,5% (7/8)	62,5% (5/8)	62,5% (5/8)	25% (2/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
	Total	27	77,8% (21/27)	44,4% (12/27)	44,4% (12/27)	25,9% (7/27)	3,7% (1/27)	0% (0/27)	0% (0/27)
Total Muestras		112	80,4% (90/112)	54,5% (61/112)	52,7% (59/112)	42% (47/112)	11,6% (13/112)	3,6% (4/112)	2,7% (3/112)

5.3.2 Detección de anticuerpos en caballos

Se recolectaron 64 muestras de suero de caballos, de las cuales 8 fueron de La Sierra, 39 del Tambo, 13 de Santander de Quilichao y 4 de Caloto. La seropositividad general fue del 90,6% (58/64). En este grupo de animales, se detectaron anticuerpos hasta la dilución 1:4096 en el 3,1% (2/64) de los casos.

Al analizar los resultados por municipios, se observó que el 100% de las muestras obtenidas de La Sierra, Santander de Quilichao y Caloto fueron positivas en la dilución 1:64. En La Sierra se detectaron anticuerpos hasta 1:1024 en el 25% (2/8) de las muestras. En Santander de Quilichao hasta 1:1024 en el 15,4% (2/13) y Caloto hasta 1:1024 con el 25% (1/4). En el Tambo la seropositividad general fue del 84,6% y la detección de anticuerpos observada fue hasta 1:4096 en el 5,1% de los casos. (Ver tabla 11).

Tabla 11. Positividad por título de anticuerpos en caballos por vereda y municipio

Municipio	Vereda	Total Muestras	Dilución 1:64	Dilución 1:128	Dilución 1:256	Dilución 1:512	Dilución 1:1024	Dilución 1:2048	Dilución 1:4096
La Sierra	Juana Castaña	8	100% (8/8)	100% (8/8)	50% (4/8)	37,5% (3/8)	25% (2/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
	El Tambo	Zarzal	18	88,9% (16/18)	88,9% (16/18)	77,8% (14/18)	66,7% (12/18)	55,6% (10/18)	16,7% (3/18)
	Placer	11	90,9% (10/11)	81,8% (9/11)	72,7% (8/11)	63,6% (7/11)	54,5% (6/11)	27,3% (3/11)	9,1% (1/11)
	Betania	10	70% (7/10)	60% (6/10)	60% (6/10)	60% (6/10)	50% (5/10)	20% (2/10)	10% (1/10)
	Total	39	84,6% (33/39)	79,5% (31/39)	71,8% (28/39)	64,1% (25/39)	53,8% (21/39)	20,5% (8/39)	5,1% (2/39)
Santander de Quilichao	L.Arriba	8	100% (8/8)	75% (6/8)	50% (4/8)	37,5% (3/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
	L.Abajo	5	100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)	40% (2/5)	0% (0/5)	0% (0/5)
	Total	13	100% (13/13)	84,6% (11/13)	69,2% (9/13)	61,5% (8/13)	15,4% (2/13)	0% (0/13)	0% (0/13)
Caloto	El Credo	1	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
	Huellas	3	100% (3/3)	33,3% (1/3)	33,3% (1/3)	33,3% (1/3)	33,3% (1/3)	0% (0/3)	0% (0/3)
	Total	4	100% (4/4)	25% (1/4)	25% (1/4)	25% (1/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	0% (0/4)
Total Muestras		64	90,6% (58/64)	79,7% (51/64)	65,6% (42/64)	57,8% (37/64)	40,6% (26/64)	12,5% (8/64)	3,1% (2/64)

5.4 Identificar las especies de *Rickettsia*, presentes en garrapatas recolectadas de animales domésticos de zonas rurales del departamento del Cauca.

La metodología de este objetivo se puede encontrar en la siguiente publicación:

Heidy-Carolina Martínez Díaz, Juliana Gil-Mora, Paola Betancourt-Ruiz, Carlos Ramiro Silva-Ramos, J. Manuel Matiz-González, María-Alejandra Villalba-Perez, María Catalina Ospina-Pinto, Alejandro Ramirez-Hernández, Luz-Adriana Olaya-M, Eliana Bolaños, Claudia Cuervo, Efraín Benavides, Marilyn Hidalgo. *Molecular detection of tick-borne rickettsial pathogens in ticks collected from domestic animals from Cauca, Colombia, Acta Tropica, Volume 238, 2023, 106773, ISSN 0001-706X, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.10677>. Anexo 8 – Artículo 2 (185)*

Se recolectaron en total 2809 garrapatas, las cuales fueron organizados y separadas en pooles (grupos) teniendo en cuenta el estadio, especie de garrapata, hospedero y municipio. Se obtuvieron 602 pooles (204 de garrapatas obtenidas de 56 perros, 272 de 45 caballos y 126 de 26 vacas). Las especies identificadas fueron: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y *Amblyomma cajennense* s.l. en perros; *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus*, y *Amblyomma cajennense* s.l. en caballos y *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus sanguineus* s.l. en vacas.

Tabla 12. Organización de pooles por especie de garrapata, estadio y hospedero

Municipio	Especie de garrapata	Estadio de vida	Número de pooles	Hospedero	
El Tambo	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Larvas	3	Vacas	
		Ninfas	7		
		Hembras	48		
			Machos	12	Vacas
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	Larvas	1		
		Ninfas	6	Perros	
		Hembras	60		

		Machos	36	Vacas (1) y Perros (35)
	<i>Dermacentor</i>	Larvas	18	Caballos
	<i>nitens</i>	Ninfas	44	
		Hembras	62	
		Machos	29	
La Sierra	<i>Amblyomma</i>	Larvas	1	Caballos
	<i>cajennense</i> s.l.	Ninfas	12	Caballos (9) Perros (3)
	<i>Dermacentor</i>	Hembras	3	Caballos
	<i>nitens</i>	Machos	1	
	<i>Rhipicephalus</i>	Ninfas	2	Perros
	<i>sanguineus</i> s.l.	Hembras	11	
		Machos	6	
Santander de Quilichao	<i>Rhipicephalus</i>	Ninfas	3	Vacas (2) y caballos (1)
	<i>microplus</i>	Hembras	47	Vacas (44) y Caballos (3)
		Machos	10	Vacas (9) y Caballos (1)
	<i>Rhipicephalus</i>	Larvas	2	Perros
	<i>sanguineus</i> s.l.	Ninfas	4	
		Hembras	42	
		Machos	26	
	<i>Dermacentor</i>	Larvas	10	Caballos
	<i>nitens</i>	Ninfas	27	
		Hembras	23	
		Machos	11	
Caloto	<i>Rhipicephalus</i>	Ninfas	1	Caballos
	<i>sanguineus</i> s.l.	Hembras	1	
		Machos	4	
	<i>Dermacentor</i>	Larvas	4	Caballos
	<i>nitens</i>	Ninfas	4	
		Hembras	16	

5.4.1 Identificación molecular de garrapatas

Todas las garrapatas identificadas morfológicamente, fueron confirmadas molecularmente. De las especies de *Dermacentor* y *Rhipicephalus*, se confirmó la identificación de todos los estadios por medio de la amplificación del gen 16S-rRNA y los estadios inmaduros de *A. cajennense* s.l., fueron confirmados como *A. patinoi*, mediante la amplificación de 16S-rRNA, *COI-1* e *ITS-2*.

Los árboles filogenéticos realizados se describen a continuación:

En las figuras 2, 3 y 4 se puede observar el árbol filogenético realizado con el gen 16S- rRNA, *ITS-2* y *COI-1* respectivamente de *A. patinoi*, allí se puede evidenciar que las secuencias obtenidas en este estudio (resaltadas con un rombo y negrilla), forman un clado (bootstrap soporte de 100% para 16S-rRNA y del 99% para *ITS-2*) con otras secuencias registrada previamente en el GenBank confirmadas como *A. patinoi* en Colombia. Para el caso del gen *COI-1*, no se recuperaron secuencias de referencia de esta especie de garrapata publicadas en el GenBank.

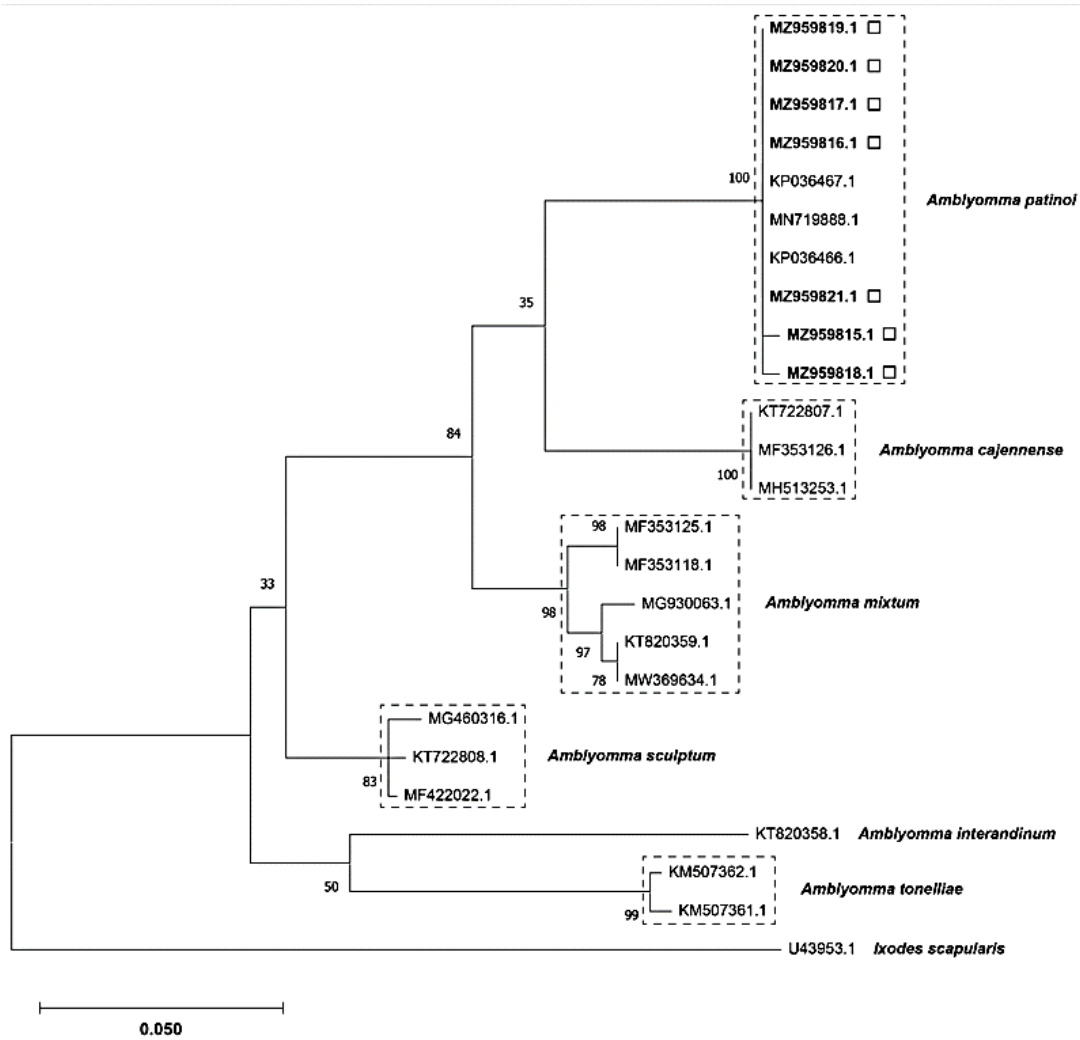


Figura 2. Árbol filogenético del gen 16S-rRNA de *A. patinoi* usando el método maximum likelihood (ML), basado en el modelo Tamura 3-parámetros con un bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrilla, señaladas con un cuadrado seguidas del número de acceso asignado en el GenBank.

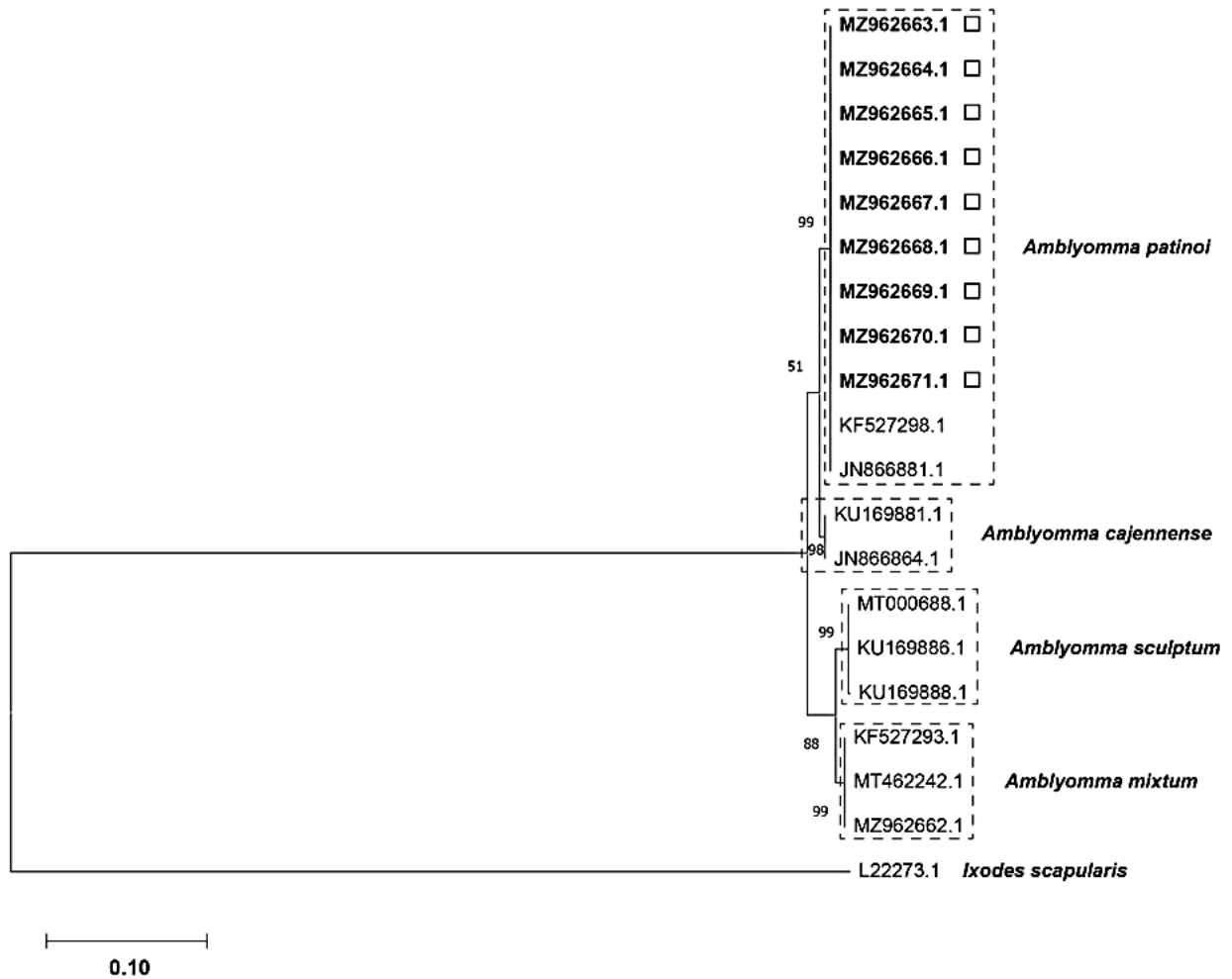


Figura 3. Árbol filogenético del gen *ITS-2* de *A. patinoi* usando el método maximum likelihood (ML), basado en el modelo Kimura 2-parámetros con un bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrilla, señaladas con un cuadrado seguidas del número de acceso asignado en el GenBank.

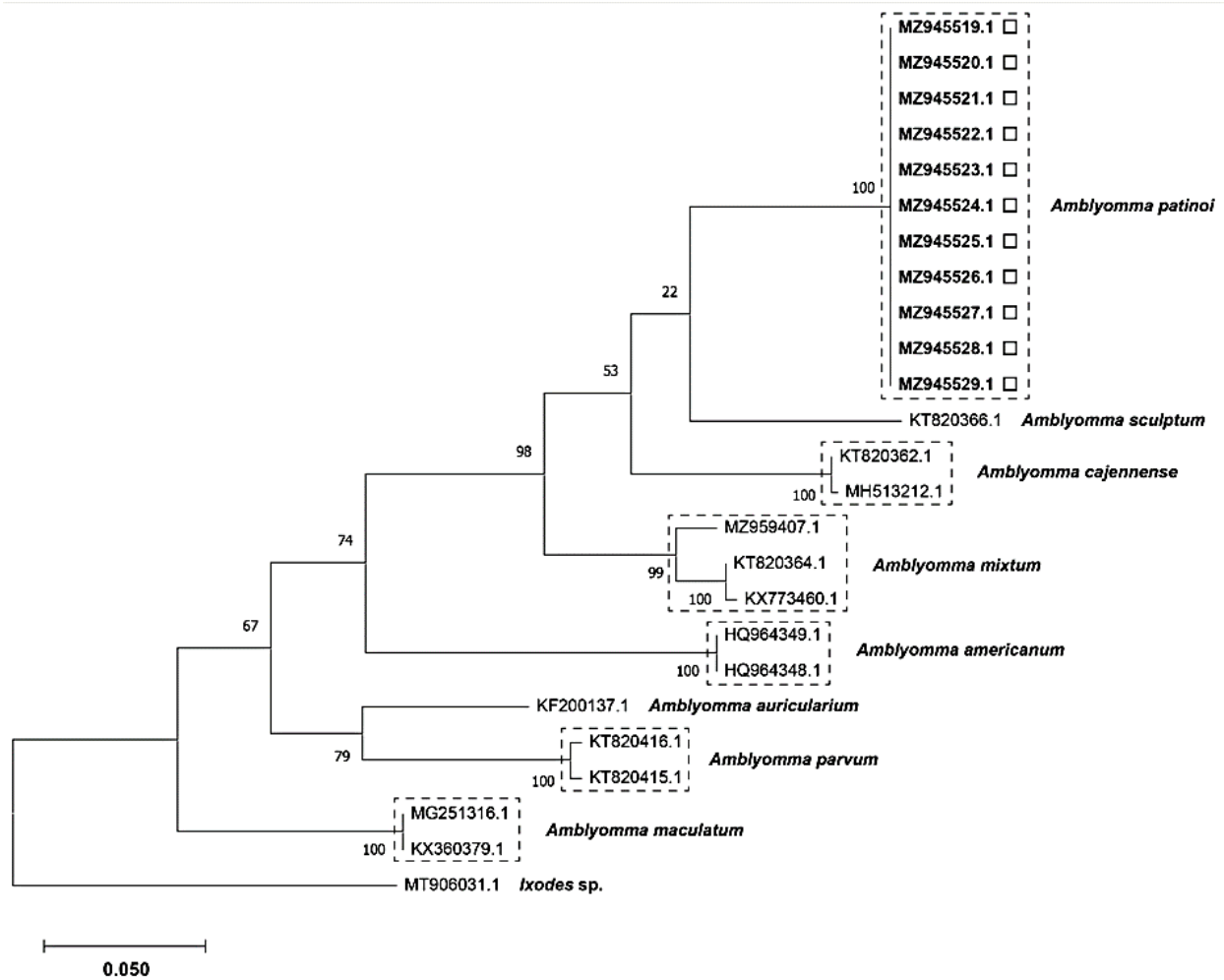


Figura 4. Árbol filogenético del gen *COI-1* de *A. patinoi* usando el método maximum likelihood (ML), basado en el modelo General Time Reversible con un bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrilla, señas con un cuadrado seguidas del número de acceso asignado en el GenBank.

En la figura 5 se observa el árbol filogenético obtenido con las secuencias de *D. nitens*, se observa que estas agruparon en tres clústeres diferentes, en el primero se observan en el mismo clado de secuencias de referencias registradas en el GenBank de diferentes países de Latino América, en el segundo solamente se observan las secuencias del este trabajo y en el tercero, se observa la agrupación con una secuencia reportada de Leticia Colombia, todas con un bootstrap en común del 98%.

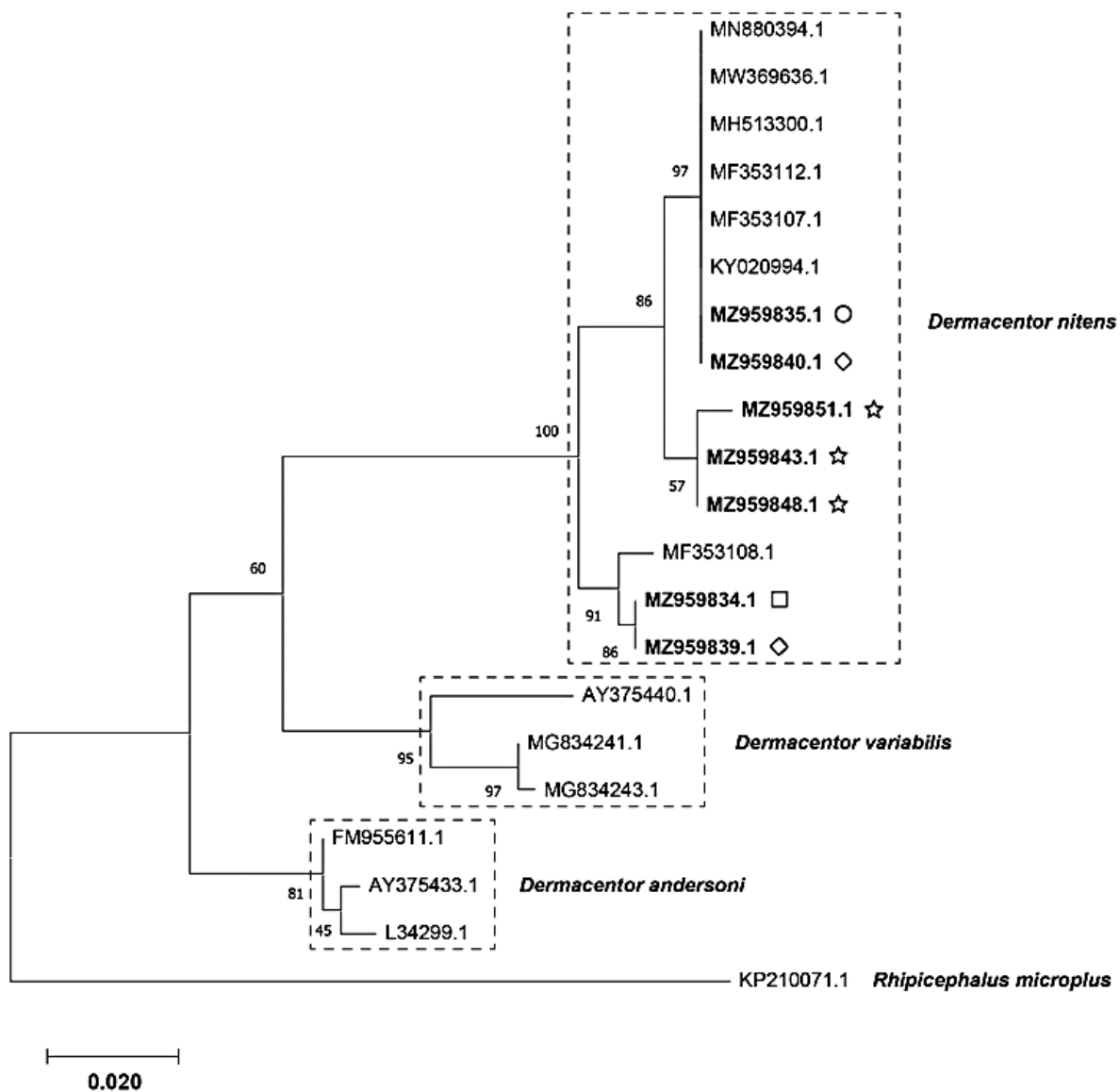


Figura 5. Árbol filogenético del gen 16S-rRNA de *Dermacentor nitens* usando el método maximum likelihood (ML), basado en el modelo Tamura 3-parámetros con un bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrilla, señaladas con una figura geométrica seguidas del número de acceso asignado en el GenBank. Las figuras corresponden a garrapatas colectadas de: Círculos (Municipio del Tambo); Rombos (Santander de Quilichao); Estrellas (Caloto) y cuadrados de La Sierra.

En la figura 6 observamos el árbol filogenético del gen 16S-rRNA de *Rh. sanguineus* s.l. y de *Rh. microplus*. En relación con este último podemos observar un clado con un bootstrap del 100% agrupando con secuencias registradas de otros países del mundo, indicando con esto posiblemente una alta conservación de este gen en esta especie de garrapata en el mundo. En el caso de *Rh. sanguineus* s.l. se realizó la búsqueda de diferentes secuencias del linaje tropical y templado, observando con esto que definitivamente las secuencias obtenidas en este trabajo hacen parte del linaje tropical junto con otras secuencias de Colombia y de países de Latino América.

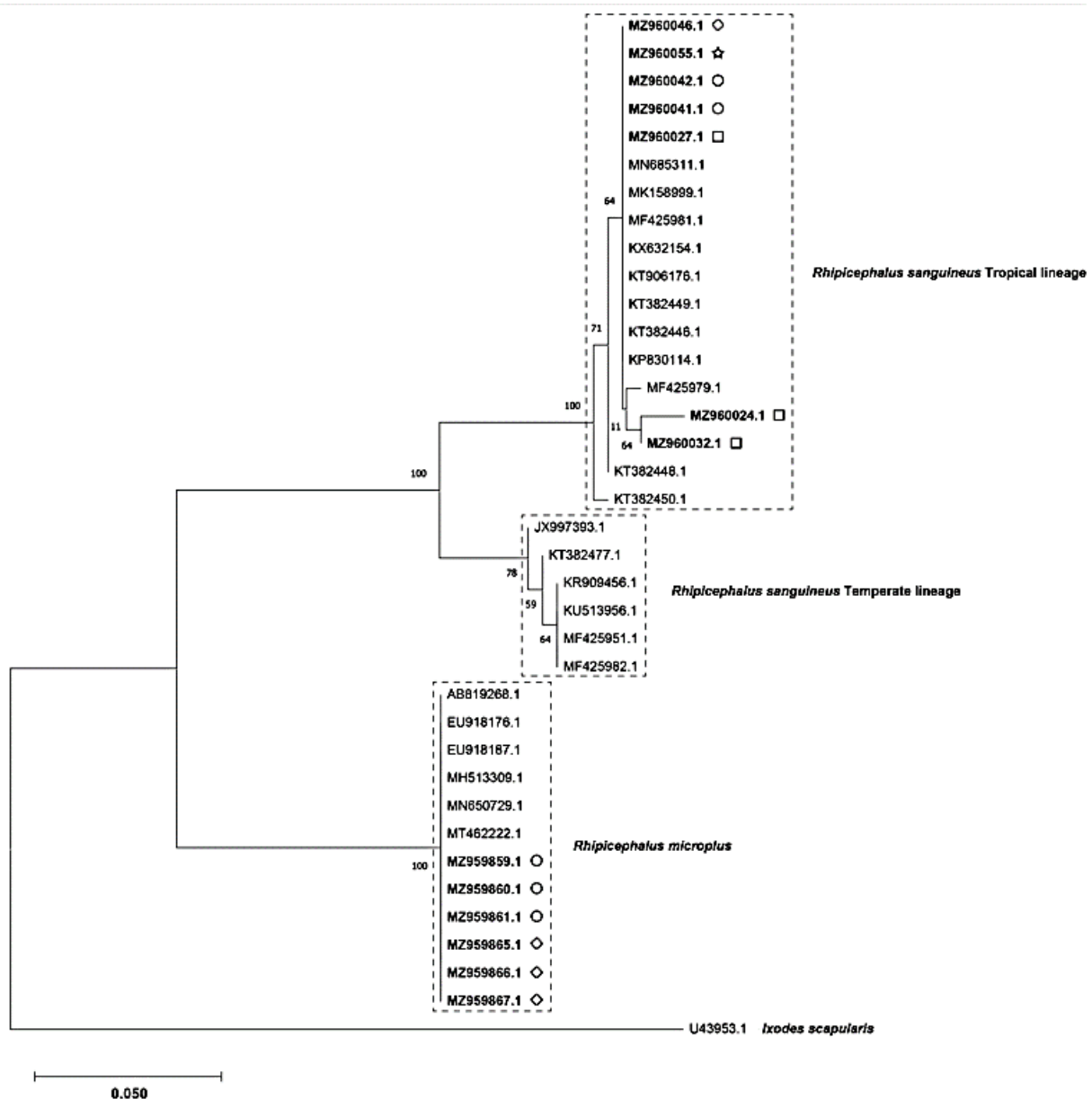


Figura 6. Árbol filogenético del gen 16S-rRNA de *Rh. sanguineus* s.l. y *Rh. microplus* usando el método maximum likelihood (ML), basado en el modelo Tamura 3-parámetros con un bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrilla, señaladas con un figura geométrica seguidas del número de acceso asignado en el GenBank. Las figuras corresponden a garrapatas colectadas de: Círculos (Municipio del Tambo); Rombos (Santander de Quilichao); Estrellas (Caloto) y Cuadrados (La Sierra).

Los números de acceso de las secuencias obtenidas en este trabajo son: Para el gen 16S-rRNA de: *Amblyomma patinoi* [MZ959815:MZ959821]; *Dermacentor nitens* [MZ959833-MZ959853]; *Rh. microplus* [MZ959859-MZ959868]; *Rh. sanguineus* s.l. [MZ960023-

MZ960055]. Para el gen *COI-1* e *ITS-2* de *Amblyomma patinoi* fueron [MZ945519-MZ945529] y [MZ962663-MZ962671], respectivamente.

5.4.2 Detección molecular de genes de *Rickettsia*

Los 602 pools de garrapatas amplificaron el gen β -*Actina* lo cual significó que el DNA no tenía inhibidores para PCR. Posteriormente se realizó la amplificación de los genes rickettsiales *htrA*, *gltA* y *ompB* todos por PCR convencional y se obtuvieron los siguientes resultados: 92% (555/602) positivos para *htrA*, de estos 10,2% (57/555) positivos para *gltA* y 7,5% (42/555) para *sca5*. Se consideraron positivos para *Rickettsia*, aquellos que fueron positivos para al menos 2 genes, los cuales correspondieron a 97 muestras que correspondieron al 16%.

Tabla 13. Positividad para *Rickettsia* spp. por especie de garrapata por municipio

Municipio	Especie de Garrapata	Pooles Positivos para <i>Rickettsia</i> / # de pooles analizados *	Porcentaje
El Tambo	<i>Rhipicephalus microplus</i>	17/70	24,3%
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	10/103	9,7%
	<i>Dermacentor nitens</i>	18/153	11,7%
Santander de Quilichao	<i>Rhipicephalus microplus</i>	23/60	38,3%
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	4/74	5,4%
	<i>Dermacentor nitens</i>	8/71	11,3%
La Sierra	<i>Amblyomma cajennense</i> s.l.	3/13	23,1%
	<i>Dermacentor nitens</i>	1/4	25,0%
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	0/19	0%
Caloto	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	3/6	50,0%
	<i>Dermacentor nitens</i>	10/29	34,5%
	Total	97/602	16,1%

*La positividad fue establecida en aquellos pools que amplificaron para al menos dos genes rickettsiales.

Para la confirmación de la especie de *Rickettsia* se secuenció el gen *sca5* para cinco pools; 1 pool perteneciente a la garrapata *Amblyomma patinoi* y 4 a *Dermacentor nitens*.

Las especies de *Rickettsia* identificadas posterior al análisis de las secuencias fueron: *Rickettsia asemonensis* de 1 pool de *A. cajennense* y de 2 pools de *D. nitens*; el porcentaje de identidad observado fue del 98.99 al 100% (Número acceso en GenBank: KY650699.1, JN315972, MK923741.1). Se identificó además *R. felis* en 1 pool de *D. nitens* con un porcentaje de identidad del 98.9 al 100% (Número acceso en GenBank: AF182279.9, GQ385243.1), y finalmente *Candidatus R. senegalensis* en 1 pool de *D. nitens* con un porcentaje de identidad del 98.9 al 100% (Número acceso en GenBank: MK548198.1, KT304219.1, KF666470, KU167060).

5.4.3 Construcción de árbol filogenético

La construcción del árbol filogenético para *Rickettsia* se realizó usando el método Maximum Likelihood basado en el método Tamura 3 parámetros (192) y construido con el Software MEGAX (191), utilizando las secuencias obtenidas en este estudio junto con secuencias de referencia obtenidas del GenBank. Posteriormente se observó que las secuencias con códigos MZ997335, MZ997337 quedaron agrupadas en el clúster de *R. asemonensis*; OK052998 en el de *R. felis* y OK052999 en *Candidatus R. senegalensis*

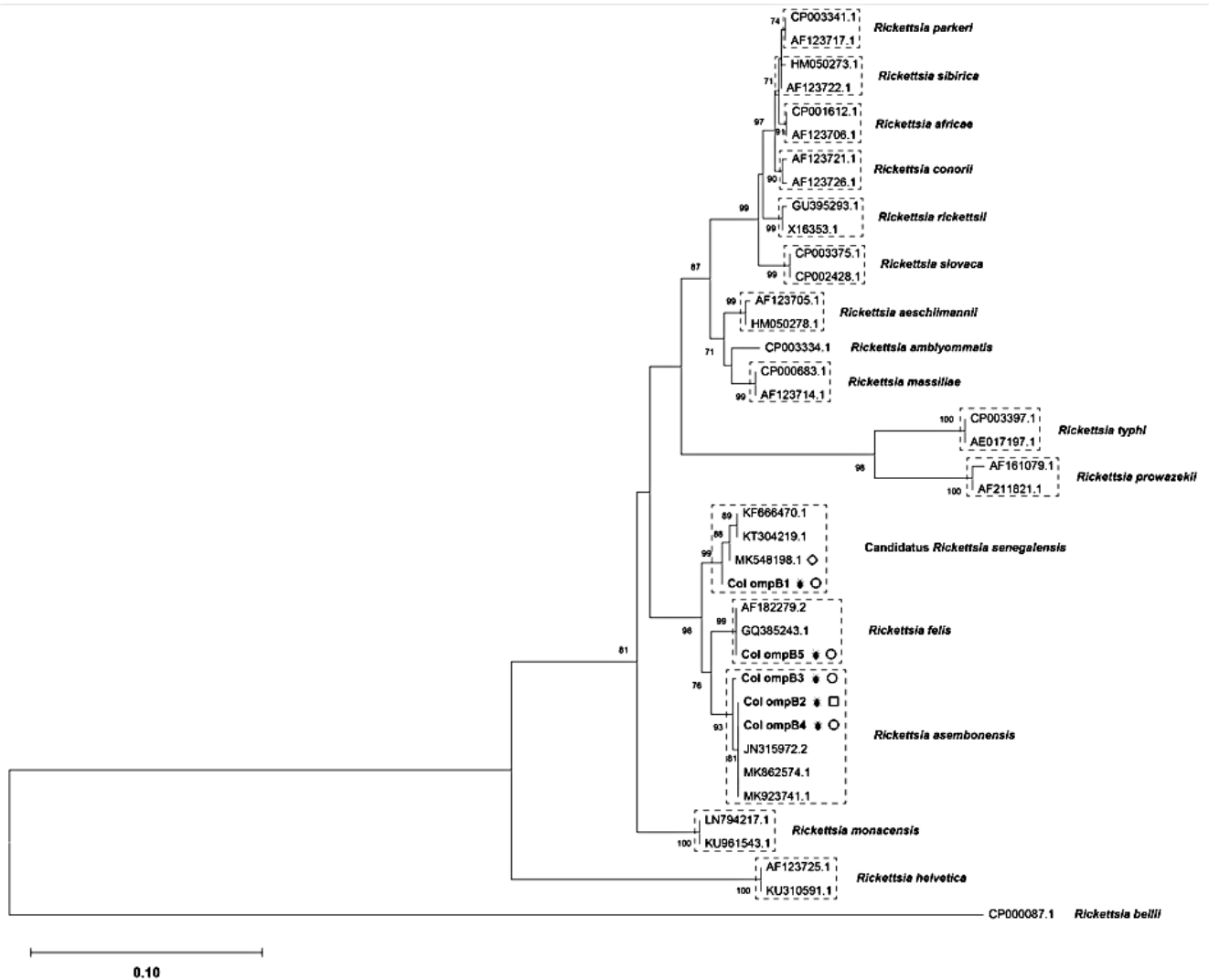


Figura 7. Árbol filogenético del gen *ompB* de *Rickettsia* usando el método maximum likelihood (ML), basado en el modelo Tamura 3-parámetros con un bootstrap de 1000 réplicas. Las secuencias obtenidas en este estudio están en negrilla, señaladas con un figura geométrica seguidas del número de acceso asignado en el GenBank. Las figuras corresponden a garrapatas colectadas de: Círculos (Municipio del Tambo); Rombos (Santander de Quilichao); Cuadrados (La Sierra).

5.4.4 Tasa de infección mínima

La Tasa de Infección Mínima (MIR por sus siglas en inglés), fue más alto en *Rhipicephalus microplus* con el 9,6% seguido por *A. patinoi* con el 6,5% y los de menor porcentaje fueron *Rh. sanguineus* s.l., *D. nitens* con el 3,3% y 2,0%, respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14 Tasa de infección mínima (MIR) por especie de garrapata

Especie de Garrapata	No. Pools	Total garrapatas	Pooles positivos para <i>Rickettsia</i>	MIR
<i>Rhipicephalus microplus</i>	130	417	40	9,6
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	202	518	17	3,3
<i>Dermacentor nitens</i>	257	1828	37	2,0
<i>Amblyomma cajennense</i> s.l.	13	46	3	6,5

5.5 Identificación de la frecuencia de rickettsiosis en pacientes sintomáticos febriles de una zona priorizada del departamento del Cauca

Para establecer la frecuencia de rickettsiosis se realizó un estudio de vigilancia centinela en el Hospital Francisco de Paula Santander (HFPS) del municipio de Santander de Quilichao; este lugar fue seleccionado teniendo en cuenta el reporte de sintomáticos febriles no diferenciados, la facilidad de acceso, seguridad pública y seropositividad encontrada.

En total se obtuvieron muestras en fase aguda y convaleciente de 22 pacientes los cuales cumplieron con los criterios de inclusión, ser mayor de 18 años con temperatura corporal superior a 37.5°C, que residieran en zona urbana o rural del municipio de Santander de Quilichao, que trabajaran en zona rural o que tuviesen antecedentes de contacto reciente con animales infestados con garrapatas, adicional a esto que presentaran sintomatología consistente con dolor de cabeza, malestar general y/o dolor articular.

De los 22 pacientes el 72% (16/22) fueron mujeres, la mediana para la edad fue de 39 años con un rango de 18 a 72 años. La ocupación de ama de casa correspondió al 41% y agricultor al 14%. Se detectaron anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en el 95% (21/22) en la dilución 1:64 tanto de las muestras de fase aguda como convaleciente. La positividad fue observada hasta la dilución 1:2048 en el 9% (2/22) de los casos. En el caso de *Rickettsia typhi*, se detectaron anticuerpos en el 77% (17/22) de las muestras en la dilución

1:64, seguido del 50% en 1:128. La positividad fue observada en este caso hasta 1:1024 en el 9% (2/22) de las muestras.

Para la prueba de Dengue, se detectaron en fase aguda anticuerpos IgG en el 22,7% (5/22) de los casos y no se detectaron anticuerpos IgM en ninguna de las muestras. En el 27,2% (6/22) de los casos se detectaron anticuerpos IgM en la prueba de ELISA para *Leptospira*.

En el hemograma se observó hemoglobina inferior al 12g/dl en el 27% (6/22) de los casos y leucocitos superiores a 10.000^{mm^3} en el 36% (8/22) de los casos todos a expensas de los neutrófilos; los demás parámetros estuvieron dentro de los rangos normales. La fosfatasa alcalina y las transaminasas estuvieron dentro de los límites normales. En la proteína C reactiva se encontraron valores de hasta 48mg/dl en el 17% (4/22) de los casos.

Se detectó en una paciente de 62 años, de sexo femenino con seroconversión para rickettsias del grupo de las fiebres manchadas. El título de anticuerpos en la muestra en fase aguda fue <1:64 y la de fase convaleciente fue de 1:512, indicando con esto un diagnóstico probable compatible con rickettsiosis. Esta paciente acudió al centro de salud con cuadro clínico de 1 semana de evolución consistente en fiebre no cuantificada, malestar general, dolor abdominal en hipogastrio que se irradiaba a región lumbar, oliguria y disuria, el diagnóstico inicial fue infección urinaria, pero posterior a su descarte fue dada de alta con diagnóstico de infección viral no especificada y manejada ambulatoriamente con analgésicos sin ninguna complicación.

En los paraclínicos se observó Proteína C Reactiva en 36mg/dl, fosfatasa alcalina y transaminasas dentro de los rangos normales, hemograma dentro de los parámetros normales con una ligera neutrofilia; dengue IgM e IgG negativo. ELISA *Leptospira* IgM positiva en fase aguda sin confirmación por otras técnicas. La paciente residía en la vereda el Águila del municipio de Santander de Quilichao y como parte de su información epidemiológica, mencionó que tenía perros en su predio, los cuales tenían ectoparásitos (garrapatas y pulgas) pero refirió no haber sido picada ni por pulgas ni por garrapatas.

5.6 Evaluación de la Competencia Vectorial de *Amblyomma patinoi* infectada con *R. rickettsii* en condiciones de laboratorio

Los resultados de este objetivo se pueden encontrar detalladamente en la publicación.

Martínez-Díaz HC, Forero-Becerra E, Hidalgo M, Labruna MB. Experimental infection and vector competence of *Amblyomma patinoi*, a member of the *Amblyomma cajennense* species complex, for the human pathogen *Rickettsia rickettsii*. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101751. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101751. Epub 2021 May 29. PMID: 34130146. (Anexo 5)

Resumen de resultados.

La temperatura media de los cobayos o conejos controles fue de 38,7°C y de los infectados 39,1°C. En total se usaron 24 animales, 12 para el grupo control y 12 para los infectados, en el grupo infectado, la mortalidad fue del 33% y en el grupo control todos los animales fueron asintomáticos en cada una de las etapas del experimento. Para los ensayos con larvas F1 y ninfas la mortalidad de los animales fue del 100%, con adultos fue del 66,6% y con larvas F2 fue del 0%. Los animales del grupo infectado presentaron fiebre, letargia y necrosis escrotal. El tiempo de alimentación medio de las garrapatas fue de 6.7 días para controles y 5,8 días para infectados. El promedio de infección en ninfas fue de 28,3%, en adultos del 83% y en larva F2 (tasa de infección filial) del 42,2%. El éxito de muda de larvas a ninfas estuvo entre el 97% y 99%, de ninfas a adultos del 99,3% al 100%. La eficiencia en la conversión fue del 54,25% al 55,52%, el porcentaje de eclosión del 85,71% al 61,37%, para controles e infectados respectivamente. La tasa de transmisión transovarial fue del 30,7%.

Si bien la garrapata *A. patinoi* demostró una perpetuación transestadial eficiente, la tasa de transmisión transovarial, transmisión filial y porcentaje de eclosión fue disminuida, de lo cual se puede inferir que *R. rickettsii* puede generar efectos deletéreos en esta y que la garrapata por si sola, no puede mantener la bacteria durante varias generaciones en condiciones naturales.

5.7 Estudio de la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en *A. patinoi* infectada con *R. rickettsii* en condiciones de laboratorio.

5.7.1. Estandarización.

El gen seleccionado como normalizador o Housekeeping fue el gen ribosomal de la proteína S3A de *A. sculptum*.

El conejo que se usó para la alimentación de los adultos no presentó ninguna sintomatología clínica asociada a rickettsiosis ni tampoco presentó ningún cambio en su comportamiento. La detección de anticuerpos en sangre contra *Rickettsia* a los 21 días post infestación fue negativa, corroborando con eso la negatividad de las garrapatas que fueron alimentadas sobre este. Este seguimiento se realizó con el fin de validar el experimento y corroborar la negatividad de las garrapatas.

Estudios realizados previamente por Martins *et al.* (2017, 2019) y Esteves *et al.* (2017), reportaron CDSs en *A. sculptum* y *A. aureolatum* los cuales presentaron cierto grado de modulación en estas garrapatas al estar infectadas con *R. rickettsii* (13,178,179). A partir de estos, se seleccionaron 17 CDSs que fueron amplificadas en muestras de *A. patinoi*, codificadas en 25 pares de iniciadores diseñados por los mismos autores

Luego de realizar la qPCR y evaluar las curvas de melting se seleccionaron 10 CDSs codificados en 14 pares de iniciadores.

Tabla 15. CDSs evaluadas en la estandarización

	CDS	Anotación	Sitio/Especie de modulación	Resultado
1	Ambaur-60175-15	Cytochrome P450	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
2	Ambaur-60175-33	Cytochrome P450	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
3	AmbarSigP-5190	α -Macroglobulin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	Se detectó
4	Ambaur-69859	Microplusin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	Se detectó
5	AmbarSigP-22173	Microplusin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	Se detectó
6	Ambaur-19862-23	5,3 kDa antibacterial peptide	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
7	Ambaur-19862-35	5,3 kDa antibacterial peptide	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
8	AmbarSigP-47654-27	Lipocalin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
9	AmbarSigP-47654-18	Lipocalin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
10	Ambaur-47378	Basic tail protein	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
11	AmbarSigP-70152	Basic tail protein	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
12	Ambaur-6577	8.9kDa protein	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
13	Ambaur-54200	Secreted protein	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
14	Ambaur-4333	Salivary secreted protein of 21.3 kDa	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>	Se detectó
15	Ambaur-45342	Lysozyme	Intestino de <i>A. aureolatum</i>	Se detectó
16	Ambaur-25926	Evasin	Intestino de <i>A. aureolatum</i>	No se detectó
17	AcajSigP-85359	Peritrophin	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
18	Acaj-48379-36	Tick defensin	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
19	Acaj-48379-41	Tick defensin	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
20	Acaj-48379-29	Tick defensin	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
21	Acaj-74395-37	Antimicrobial peptide	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
22	Acaj-74395-35	Antimicrobial peptide	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
23	Acaj-60304	Peptidoglycan recognition protein	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
24	AcajSigP-6765	ML domain protein	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó
25	AcajSigP-79349	Glycolate oxidase	Intestino de <i>A. sculptum</i>	Se detectó

Posterior a la realización de las curvas estándar, se seleccionaron 7 CDSs de 8 pares de iniciadores teniendo en cuenta porcentajes de eficiencia superiores a 93%. Estos CDSs fueron reportados previamente como secuencias reguladas y no reguladas en las garrapatas *A.*

sculptum y *A. aureolatum* infectadas con *R. rickettsii*. La concentración de trabajo establecida fue de 50ng.

Tabla 16. CDSs seleccionadas en la estandarización

	CDS	Anotación	Sitio/Especie de modulación
1	AmbarSigP-5190	α -Macroglobulin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>
2	Ambaur-69859	Microplusin	
3	AmbarSigP-22173	Microplusin	Glándula salival de <i>A. aureolatum</i>
4	AcajSigP-85359	Peritrophin	Intestino de <i>A. sculptum</i>
5	Acaj-74395-37	Antimicrobial peptide	Intestino de <i>A. sculptum</i>
6	Acaj-60304	Peptidoglycan recognition protein	Intestino de <i>A. sculptum</i>
7	AcajSigP-6765	ML domain protein	Intestino de <i>A. sculptum</i>
8	AcajSigP-79349	Glycolate oxidase	Intestino de <i>A. sculptum</i>

Luego de la estandarización, se procedió a realizar los experimentos con cada CDSs de manera individual. Los montajes fueron realizados por triplicado y, con el fin de garantizar las condiciones, en la misma placa se montaron tanto el gen ribosomal como los genes problema, de las muestras del grupo control como del grupo infectado.

5.7.2. Ensayos con larvas

La expresión del gen ribosomal de la proteína S3A de *A. sculptum* (normalizador o Housekeeping) en los pooles de larvas, varió en todos los ensayos realizados con una diferencia de hasta 7 puntos, con esta variabilidad del normalizador no fue posible establecer la expresión de los CDS.

5.7.3. Ensayos con ninfas

A continuación se resaltan los resultados obtenidos con las CDSs testadas.

Para α -Macroglobulin (Figura 8), se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un $p= 0,0050$, siendo completamente reprimida la expresión cuando la garrapata fue infectada en condiciones de laboratorio con *R. rickettsii*.

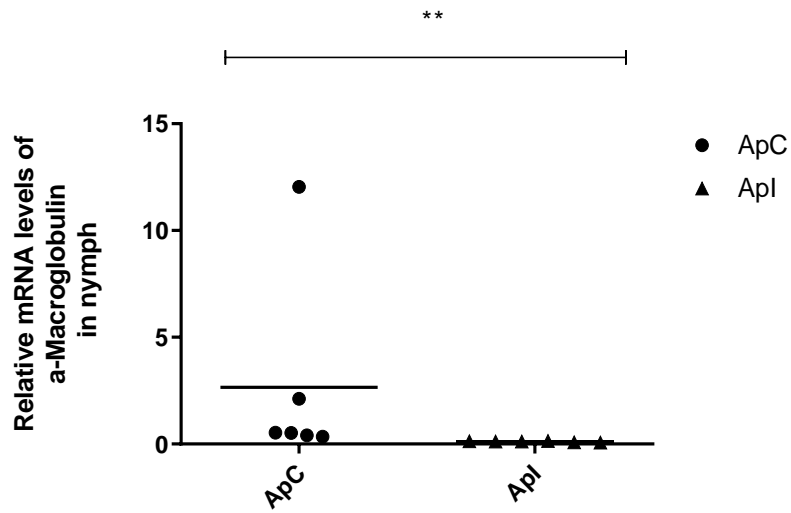


Figura 8. α -Macroglobulin en Ninfas

Para la microplusina 22173 (Figura 9), la diferencia estadística correspondió a un $p=0,0238$, observando que durante la infección esta microplusina también es reprimida.

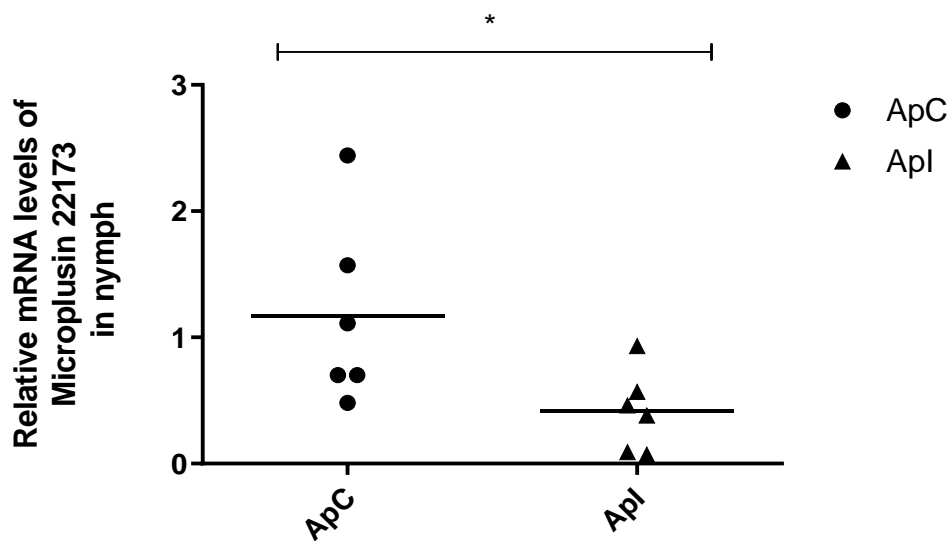


Figura 9. Microplusina 22173 en Ninfas.

Otra de las CDSs con las cuales se observó una represión en la expresión al ser infectada, fue el péptido antimicrobiano Acaj-74395-37 con un $p=0,0411$. Figura 10

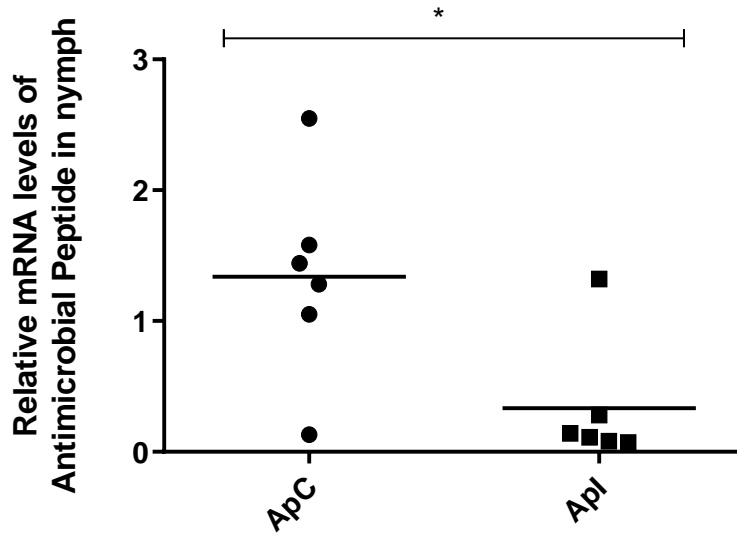


Figura 10. Péptido antimicrobiano Acaj-74395-37 en Ninfas

La única CDSs con la cual se observó una estimulación posterior a ser infectada fue la peritrofina reportada previamente como reprimida en intestino de *A. sculptum*. $p= 0,0260$.

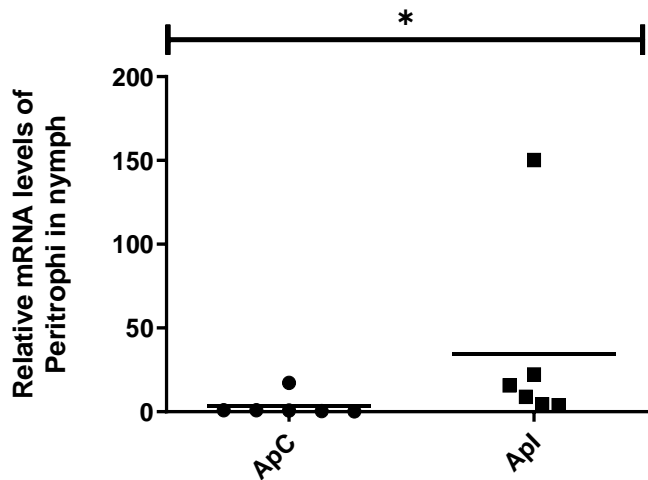


Figura 11. Peritrofina en Ninfas

Con las demás CDSs: microplusina 69859, $p=0,5211$ (figura 12) y Proteína de reconocimiento al peptidoglicano $p=0,1320$ (figura 13), los resultados obtenidos no fueron estadísticamente

significativos infiriendo con esto que no hubo diferencias en la expresión entre garrapata infectada y no infectada con *R. rickettsii*.

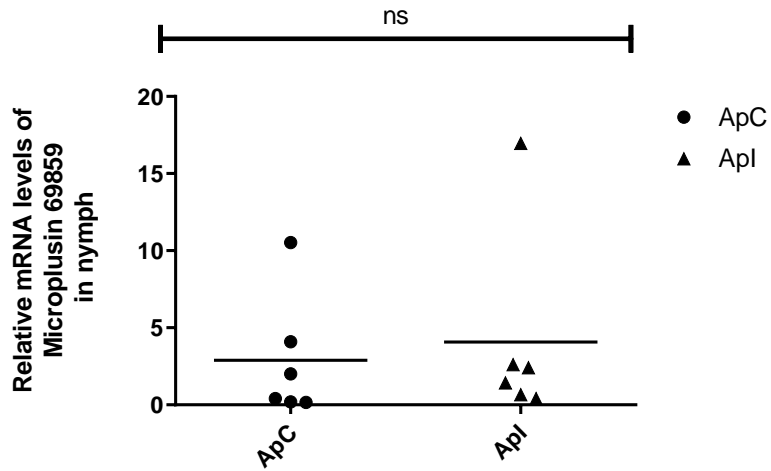


Figura 12. Microplusina 69859 en Ninfas

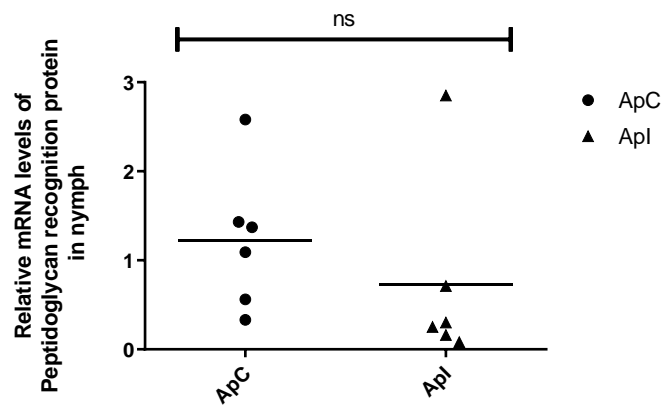


Figura 13. Proteína de reconocimiento al peptidoglicano

5.7.4. Ensayos con intestino

En los ensayos realizados con intestino de *A. patinoi* solamente se observaron cambios en la expresión del péptido antimicrobiano, siendo este reprimido en el grupo infectado, $p=0.0022$ (figura 14); con las demás CDSs evaluadas, no se observó ningún cambio en la expresión entre el grupo control y el infectado.

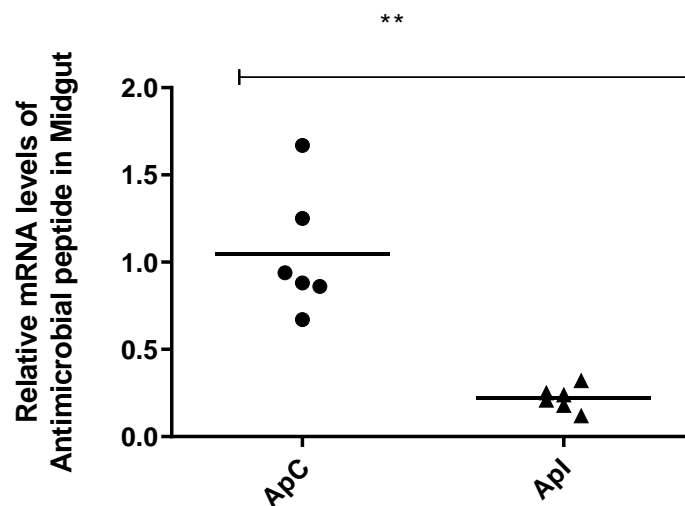


Figura 14. Péptido Antimicrobiano en Intestino de adultos

5.7.5. Ensayos con glándula salival

Finalmente, en glándula salival, no se obtuvo amplificación de ninguna de las CDSs seleccionadas para este estudio.

6 DISCUSIÓN

En este estudio se determinó la presencia de anticuerpos contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (SFG) en población rural de 4 municipios del departamento del Cauca. Se encontró una seropositividad general del 85,7% en humanos y los anticuerpos fueron detectados hasta el título 1:2048 en el 1% de las muestras que correspondieron a 3

participantes, uno del municipio del Tambo y dos de Santander de Quilichao. Estos resultados indican que existe circulación de especies de rickettsias transmitidas por garrapatas, y se suma a los datos publicados previamente en el Cauca, con resultados similares, como el realizado por Weber N, *et al.*, 2020, quienes reportaron una seropositividad del 79% (34), además de notificar la presencia de lesiones pruriginosas crónicas, asociadas a picaduras constantes de garrapatas en el 94,5% de los participantes. Por otro lado, nuestros resultados son mayores al 49% registrado por Peña *et. al* 2013 en la población de La Sierra en el Cauca (33), quienes además reportaron 3 casos positivos para rickettsiosis, confirmados por seroconversión.

Estudios similares realizados en Colombia han reportado diferentes porcentajes de detección de anticuerpos contra SGF en humanos que van desde 2,7% en el Urabá Antioqueño en el 2013 (206) hasta el 59% en el departamento del Meta (207). Otros departamentos como Córdoba (208), Cundinamarca (24,209) y Antioquia (32,210) registran valores hasta del 49%, 40,3% y 29%, respectivamente.

Así mismo se registra una seropositividad del 7,8% en trabajadores de áreas rurales del departamento de Sucre en el 2008 (211); 16,3% en zona rural del municipio de Toluviejo, Sucre en el 2015 (212), y en indígenas de los departamentos de Cesar, Guajira y Córdoba porcentajes del 32%, 11% y 5,2%, respectivamente en el 2015 (213,214).

En el año 2017, se reportó un estudio sobre seropositividad para rickettsias del SFG en humanos en zonas endémicas del noroeste del país encontrando un 40,8% en Alto de Mulatos, 36,5% en el pueblo de Las Changas, 33,3% en el pueblo de El Mellito y 31,8% en los distritos de Contrapunto y Corea del municipio de Los Córdoba (215).

Recientemente, Perez *et al.*, 2021, en un estudio realizado en pacientes que acudieron a diferentes centros de salud del departamento de Caldas durante el 2016 al 2019, encontraron una seropositividad contra *R. rickettsii* del 60%, así como la evidencia de circulación de otras especies como *R. typhi* y *R. felis* en humanos (216).

Si bien los porcentajes encontrados en este estudio distan de otros referenciados en la literatura no sólo de Colombia sino de otros países como, Chile, Brasil, Argentina, México donde los porcentajes no superan el 10% (126,217–221) o Panamá con un máximo de 39% (222), es importante resaltar que el departamento del Cauca es una zona poco explorada hasta la fecha en lo que a rickettsiosis se refiere y de acuerdo con nuestros resultados y los reportados por Weber *et. al* 2020 (34) y Peña *et. al* 2015 (33) junto con información recibida (verbalmente) de parte de la secretaria Departamental de Salud del Cauca y las comunidades,

se puede afirmar que la población rural especialmente de La Sierra y del Tambo están expuestos a contacto directo y constante con garrapatas.

Es por esto que se infiere sobre la posible circulación de especies de *Rickettsia* (probablemente no patógenas o de baja virulencia) responsables de estos niveles de anticuerpos. Esta hipótesis va de la mano con dos situaciones: 1) la reacción cruzada que existe en ensayos de inmunofluorescencia con las diferentes especies de rickettsias filogenéticamente relacionadas (49) y 2) por ausencia de reportes sobre fallecimientos por síndromes febriles exantemáticos complicados en las zonas exploradas (datos indagados durante el estudio de campo). Es de mencionar también, que debido a que no tuvimos la posibilidad de determinar la seropositividad con varios antígenos de rickettsias, no podemos asociar alguna especie en particular a estos altos porcentajes.

Respecto a los factores asociados, se tuvieron en cuenta todas las variables de la encuesta aplicada, pero solamente la actividad laboral (agricultor) fue el factor estadísticamente significativo. Este resultado no es diferente al que posiblemente se estaba esperando ya que este oficio requiere que las personas estén en campo abierto expuestos a diferentes tipos de ambientes y en contacto estrecho con animales domésticos y por tanto con sus parásitos externos. Estudios realizados por Quintero *et al.*, 2017 establecieron de igual forma que los trabajos a campo abierto son un factor asociado a la positividad para *Rickettsia*, así mismo encontraron otros factores como la edad y sexo masculino como determinantes en esta positividad, debido posiblemente a que es común que hombres desarrollen estas actividades a diferencia de las mujeres (223). Contrariamente, nosotros no encontramos que la edad o el sexo fuesen un factor asociado e incluso el mayor porcentaje de participantes que tuvimos fue en mujeres. De igual forma, estudios realizados en Carolina del Norte en Estados Unidos, (224) y en Perú (225) establecieron que las actividades de agricultura son un factor de riesgo para estar en contacto con garrapatas y sus patógenos, en este caso *Rickettsia*.

En relación con la seropositividad en animales, se encontró una prevalencia general en perros del 80,4% y se encontraron anticuerpos hasta el título 1:4026 en el 2,7% de las muestras (3 perros). Estos resultados son más altos a los reportados previamente en Colombia y en otros países como Brasil, donde se registran seroprevalencias en perros desde 3,3% hasta 69,6% (126,226–229), así como en regiones de México (152), Chile (230) y Bolivia (231), donde se reportan prevalencias en perros hasta del 65%, 35% y 68,2%, respectivamente. En Colombia,

Hidalgo *et al.*, 2009 publicaron una seroprevalencia en perros del 18,2% en el municipio de Villeta en Cundinamarca (135), y estudios realizados en el Noreste del país registran prevalencias hasta del 38,23% (223).

En Caballos se encontró una seroprevalencia del 90,6% y la detección de anticuerpos se observó hasta el título 1:4096 en el 3,1% de las muestras (2 caballos). Estos resultados también son más altos a los reportados en Colombia y otros países, como Brasil donde se registran seroprevalencias en caballos entre el 8% y el 77,3% (227,232–234). En Colombia, se han publicado seroprevalencias en caballos del 16,3% en Cundinamarca (135) así como del 1,9% en la Orinoquia (136), y de hasta el 30,88% en municipios de Córdoba (223).

Los resultados obtenidos en estos animales son un aporte adicional a la hipótesis que en las zonas rurales seleccionadas circula alguna especie de *Rickettsia*. No obstante, no es del todo posible asociar una causa particular para explicar las diferencias (en seroprevalencia) entre lo reportado en la literatura y lo obtenido en este estudio, pero es importante mencionar que durante el tiempo de trabajo de campo no se observó, ni un buen control de garrapatas ni de otros parásitos externos, ni mucho menos una tenencia responsable de mascotas; adicionalmente todos los animales muestreados estaban infestados con garrapatas, algunos en mayor nivel que otros.

En el caso particular de los perros y como se observa en la mayoría de las zonas rurales en Colombia, los perros tienen libre circulación incluso por zonas boscosas donde la presencia de animales silvestres es frecuente, facilitando con esto, no sólo la infestación con garrapatas sino la infección con diversos patógenos como las rickettsias y, por tanto, facilitando su diseminación a otros animales con los cuales comparten el entorno intradomiciliario(122–124).

En el caso de los caballos, se observó que estos son utilizados en su mayoría para transporte y en muchas de las situaciones son desplazados a lugares muy distantes, donde posiblemente también tengan contacto con animales silvestres, sus parásitos externos y por ende sus patógenos.

Esta situación es concordante con la teoría postulada por Sangioni *et al.*, 2005 (235) quienes argumentan que debido al uso que se le da a los caballos en el transporte rural, estos mamíferos pueden actuar como un hospedero transporte de garrapatas infectadas causando nuevos focos de infección en diferentes áreas (232,235,236), así mismo resaltan la importancia de los caballos en la epidemiología de la rickettsiosis ya que según ellos, estos mamíferos son los hospederos primarios de todos los estadios de especies de garrapatas

Amblyomma como *A. sculptum* en Brasil (235). Así mismo proponen que la realización de estudios de seroprevalencia en caballos es un método útil para la vigilancia de rickettsiosis en áreas donde los humanos están expuestos a las garrapatas especialmente de la especie *A. cajennense* s.l., (235).

A pesar de que se ha comprobado que los caballos no son amplificadores naturales de *R. rickettsii* (127), estos desarrollan anticuerpos IgG posterior a la infección por esta bacteria que permiten establecer, si en la región explorada existe circulación de este patógeno (127). Por otra parte, en perros se ha establecido que desarrollan signos de infección ocasionados por *R. rickettsii* y por tanto su papel amplificador para esta bacteria es potencial (237), es por esto que independiente de la sintomatología desarrollada posterior a la infección, estos mamíferos son considerados actualmente como animales centinela para la detección de rickettsias del SFG en áreas endémicas, aún antes de la aparición de casos humanos (57,227,235,238).

De la mano de la seroprevalencia en mamíferos, la identificación de garrapatas y sus patógenos como las rickettsias hacen parte de la indagación de la epidemiología de una enfermedad zoonótica como la rickettsiosis. Es así que en nuestro estudio se identificaron diferentes especies de garrapatas recolectadas de perros, caballos y vacas. Las especies identificadas tanto morfológica como molecularmente correspondieron a los géneros *D. nitens*, *Rh. sanguineus* s.l., *Rh. microplus* y *Amblyomma patinoi*. Estas garrapatas previamente han sido reportadas previamente no sólo en Colombia sino en diversos estudios en países de América (82,85,95,239,240).

Rhipicephalus microplus fue recolectada en su mayoría en vacas y en un caballo del municipio de Santander de Quilichao y su hallazgo se limitó a este municipio y al Tambo, probablemente porque fueron las únicas zonas donde encontramos vacas durante el muestro. Esta especie ha sido reportada en diferentes regiones de América (26,85,134,240,241) y está catalogada como una de las de mayor importancia en medicina veterinaria por el impacto que tiene en salud animal (74,242) así como en el ámbito económico por la producción de leche, carne y pieles que se ven significativamente afectados por las enfermedades que producen los patógenos transmitidos por estas (242). En el análisis filogenético realizado se observó que esta especie se agrupó en un sólo clúster con secuencias reportadas de países de centro y sur América como Argentina, Guayana Francesa, Cuba y Colombia, así como con secuencias

de Japón y Mozambique (ver figura 15) con un bootstrap del 100%. Infiriendo con esto la baja variabilidad del gen 16S-rRNA entre la especie incluso de diferentes regiones del mundo.

En la identificación de genes rickettsiales se estableció que el 30% de los pools analizados fueron positivos para al menos dos genes de *Rickettsia* con un MIR (tasa de infección mínima) del 9,6% (40/417). Estos resultados son inferiores al 50% reportado en Panamá (113), sin embargo, el tamaño de la muestra en este estudio fue de solamente 10 ejemplares. Contrariamente es superior al reportado por Perquera *et al.*, en Ecuador del 5,3% (243) y por Troyo *et al.*, 2016 en Costa Rica del 6,5% (240). Así mismo es inferior al MIR reportado en Brasil por Moura-Martiniiano *et al.*, 2014, quienes hallaron un MIR del 3,0% (244) y al publicado en Costa Rica en el 2016 del 0,4%, quienes además identificaron *Rickettsia amblyommatis* en esta especie de garrapata (240).

Actualmente no se ha establecido el rol de *Rh. microplus* en la transmisión de especies de rickettsias y existe la posibilidad que su infección se deba a una transmisión horizontal con especies involucradas en la transmisión de *Rickettsia* como las garrapatas del género *Amblyomma* sp., y *Rh. sanguineus* s.l., (113). De esta forma valdría la pena indagar más sobre su rol en la epidemiología de esta zoonosis, ya que se ha establecido que puede infestar otros hospederos que a su vez son infestados por otras especies de garrapatas (85).

Rhipicephalus sanguineus s.l., es conocida como la garrapata marrón del perro, puede actuar como vector de diversos patógenos que afectan no sólo a los perros sino también a los humanos (245,246), además se ha reconocido como potencial vector de *R. rickettsii* (89). Se sabe que existen dos especies bajo este taxon que son genética, morfológica, biológica y geográficamente distintas, una es frecuentemente encontrada en regiones tropicales y subtropicales “linaje tropical”, donde se ha establecido que es activa durante todo el año y que puede completar entre tres y cuatro generaciones al año, siempre y cuando las condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de hospederos sean favorables (247,248), y la otra reportada en zonas templadas “linaje templado”, que si bien en este ambiente no da lugar a varios ciclos poblacionales durante un año, se dice que en estas regiones la mayor actividad se da entre el final de la primavera y el inicio del otoño (245,249,250).

En el análisis filogenético se observó que las secuencias obtenidas del Cauca agruparon en el clúster de *Rh. sanguineus* “linaje tropical” con un bootstrap del 62%, y está relacionado con secuencias de diferentes partes del mundo. Con este valor de bootstrap se puede inferir que

posiblemente exista variabilidad en el gen 16s rRNA de esta especie en particular. Esta filogenia es concordante con la preferencia ecológica de esta garrapata ya que las zonas estudiadas en el Cauca se caracterizan por tener un clima tropical.

La positividad de *Rh. sanguineus* con especies de rickettsias ha sido reportado ampliamente en diferentes países como Estados Unidos (101) México (102–104) Brasil (105) Argentina (111,251), Costa Rica (240) y Panamá (113), entre otros. En Argentina la prevalencia de infección de *Rickettsia* sp., en esta garrapata está entre el 4,76% al 12% (111,251,252), en Panamá entre el 3,4% y el 20,3% (113,114,253), en Costa Rica del 1,3% (240) y en México entre 3,2% a 8% (103,104,154,158).

Se reportan además tasas de infección mínima del 3,3% en México (102), en Brasil del 3,2% (254) y Costa Rica del 0,1% (240). Valores que son similares a los encontrados en este estudio del 8,4% (tasa de infección) con un MIR del 3,3. Es importante mencionar que las especies que han sido identificadas en esta especie de garrapata son *R. felis* en Brasil (254) así como *Candidatus R. amblyommii* en Costa Rica (240) y Panamá (114,253).

Si bien esta especie de garrapata aún no es reconocida como potencial vector de *R. rickettsii* en Colombia, existen estudios donde se ha comprobado su competencia en la perpetuación transestadial y transovarial de este patógeno en condiciones de laboratorio (170) así como su importancia como vector en algunas regiones de Estados Unidos y México; situación que debe ser considerada en la búsqueda de determinantes relacionados con la epidemiología de esta zoonosis.

Dermacentor nitens ha sido especialmente asociada a caballos, sin embargo también se ha reportado en otros mamíferos (85,134,255), en este estudio se encontró parasitando únicamente caballos. En el análisis filogenético interesantemente se observó que las secuencias del Cauca agruparon en tres clúster, cada uno con bootstrap superior al 80% (figura 14); se destaca que las secuencias de garrapatas del municipio de Caloto, agruparon en un clúster independiente, mientras que las otras de los demás municipios formaron los otros dos clúster restantes. Para establecer la causalidad de este fenómeno se tendría que hacer análisis más robustos de filogenia y evolución para así dilucidar las causas, algo que no estaba en el alcance de esta tesis, no obstante, se podría inferir que este gen es altamente variable en *D. nitens*.

De otro lado, en esta especie, se han reportado diferentes tasas de infección de *Rickettsia* sp. La literatura reporta porcentajes del 10%, 1,7%, 27,4% y 16% en Costa Rica (240) Brasil (254) Panamá (113,114) y Cuba (256) respectivamente, así como la identificación en esta garrapata de *Candidatus* *R. amblyommii* en Costa Rica (240), *R. felis* en Brasil y Cuba (254,256), *R. amblyommii* y *R. rickettsii* en Panamá (113,114). En Colombia se ha reportado tasas de infección del 26,3% en el Norte del país (257). Estos valores son más bajos a los encontrados en este estudio, del 37%, pero cercanos a los previamente publicados en Colombia.

A pesar que *R. felis* había sido relacionada solamente con pulgas, en los últimos años se ha reportado en diversas especies de garrapatas, además se ha identificado en sangre de caballos en Nicaragua, así como lo reportan Tyrrell *et al.*, 2019 (258). En este estudio, se identificó en *D. nitens* la presencia de *R. felis*, *R. asembonensis* y *Candidatus* *R. senegalensis*, que pese a no ser reportada previamente en garrapatas en Colombia, se han reportado en otros países de Latinoamérica infectando no sólo *D. nitens* sino también *Rh. sanguineus* s.l. (259–261). Independientemente que aún no se haya establecido el potencial patogénico de estas rickettsias, es posible que estén involucradas en la formación de anticuerpos en animales y humanos.

La última especie de garrapata reconocida fue *A. patinoi*. Esta especie fue identificada luego de la secuenciación de tres genes *COI*, *ITS-2* y *16S-rRNA*. En el análisis filogenético se observó que las secuencias del Cauca agruparon en un clúster con Bootstrap del 99% y 100% con secuencias de Colombia previamente depositadas en el GenBank. Esta garrapata ha sido reportada en Cundinamarca (25) y en municipios del Noreste de Colombia (262,263). En el Cauca previamente había sido reportada *A. patinoi* por Peña *et al.*, 2015 (33) y *A. cajennense* s.l. por Weber *et al.*, 2020 en veredas de El Tambo (34). Vale la pena mencionar que estos estudios fueron realizados, el primero en la misma vereda de La Sierra donde realizamos los muestreos y el segundo en una zona cercana a este, es por esto que podemos afirmar que para el departamento del Cauca, la frontera entre el municipio de La Sierra y El Tambo, en la veredas de Juan Castaña, Quilcacé y la Alianza serían el lugar de preferencia de especies del complejo *A. cajennense* como *A. patinoi* ya que existe la posibilidad que haya otra especie del complejo, puesto que esta frontera está separada por un río.

Este hallazgo es concordante con los modelos potenciales de distribución geográfica y climática del complejo *A. cajennense*, publicados por Acevedo-Gutiérrez *et al.*, 2018, quienes

establecieron de acuerdo con datos climáticos y ecológicos las potenciales regiones en Colombia donde podrían circular especies del complejo, entre estos se resalta del departamento del Cauca la región del macizo colombiano donde está ubicada la vereda Juana Castaña incluida en este estudio.

Las garrapatas del complejo *A. cajennense* son ampliamente distribuidas en centro y sur América, además es uno de los géneros más antropofílicos y actualmente el principal vector de *R. rickettsii* en América. La especie de *Rickettsia* identificada en el Cauca en este estudio fue *R. asemonensis* en *A. patinoi* que si bien aún no está esclarecido su rol en procesos infecciosos sintomáticos, podría estar involucrada en los porcentajes de prevalencias tan altos en esta región, ya que para *A. patinoi* la tasa de infección por *Rickettsia* sp., fue del 23,1% con un MIR del 6,5%, el más alto reportado, en comparación con las otras especies de garrapatas registradas en este estudio, e incluso con lo reportado en la literatura, donde se destacan los bajos porcentajes de infección natural por *Rickettsia* en garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense*, como es el caso de Brasil donde reportan tasas de infección hasta el 1,28% (160,264), este hallazgo posiblemente se deba a la disponibilidad de hospederos amplificadores que quizá haya en la región los cuales permiten el mantenimiento enzoótico de esta bacteria y se ajusta al tipo de ambiente observado en Juana castaña que además de distante es complementemente montañoso.

Resulta difícil poder establecer las causas reales entre los diferentes porcentajes de infección observados, ya que no se puede asociar a una variable en particular puesto que estos hallazgos son multifactoriales. Sin embargo, es importante resaltar que cada vez más se observan diversas especies de garrapatas infestando una amplia gama de mamíferos que antes no infestaban, así como diversas especies de rickettsias colonizando vectores, que antes no colonizaba; este es el caso de *R. felis* que inicialmente se relacionaba solamente con pulgas, ahora no sólo se reporta en garrapatas de diversas especies, sino también en sangre de caballos, como el mencionado anteriormente publicado en Nicaragua.

Así también se destaca a *R. amblyommii* que, si bien tampoco se ha esclarecido su poder patogénico en animales ni humanos, la literatura reporta estudios donde las seroprevalencias en animales y humanos se asocian a esta especie, además interesantemente Rivas *et al.*, 2015, realizaron un estudio de infección experimental con Cobayos y esta especie de *Rickettsia*, estableciendo que *R. amblyommii* sí ocasiona sintomatología de infección en cobayos así como la generación de anticuerpos protectores contra infecciones posteriores con

R. rickettsii (265). Es por esto que es necesario contemplar diversas especies de rickettsias como potencialmente patogénicas, aún sin haberse establecido su poder infeccioso.

Continuando con los resultados, ya no relacionados directamente con garrapatas infectadas, se realizó un piloto de estudio centinela en el Hospital municipal de Santander de Quilichao, allí se encontró un paciente febril con probable diagnóstico de rickettsiosis por rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (Antígeno *R. rickettsii*) y ninguno para rickettsias del grupo del tifus (*R. typhi*) con una frecuencia de infección del 4,54% (1/22), con una posible COInfección con *Leptospira* sp., (este resultado no se pudo confirmar).

Este paciente resolvió su sintomatología con sólo analgésicos, no presentó complicaciones y sus hallazgos de química sanguínea y hematología estuvieron dentro de los límites de la normalidad, excepto la proteína C reactiva que se observó ligeramente aumentada 36mg/dl (VR <6 mg/dl). Este hallazgo indica la circulación de alguna especie de *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas y plantea un reto para el personal médico, debido a la presentación clínica tan inespecífica y la imposibilidad de conseguir pruebas de diagnóstico en los centros de salud del país, especialmente el reto está cuando se enfrenta a un caso por una *Rickettsia* patógena como *R. rickettsii*. Por otro lado la presencia de anticuerpos sin seroconversión en los demás participantes indica la exposición previa a estas rickettsias, información importante que se debe tener en cuenta en el diagnóstico de síndromes febriles inespecíficos en la región.

Estudios realizados en Colombia reportan frecuencias del 2,7% (6/220) para rickettsiosis en municipios de Córdoba y Antioquia (266), del 2,9% (3/104) en Cundinamarca (267), y del 6,38% (3/47) para SFG y grupo transicional y del 2,1% (1/47) para el grupo del tifus en el departamento de Caldas (216). En Estados Unidos se reportan incidencias de rickettsiosis del 12% para *R. parkeri*, 9% para *R. amblyommii* y 6% para *R. rickettsii* (224). En estos estudios se resalta la mayor frecuencia en hombres, contrario al realizado en Cauca donde la mayoría de los participantes fueron mujeres.

Con este único caso detectado en el estudio y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los objetivos anteriores podemos inferir que efectivamente hay una especie o varias especies de rickettsias transmitidas por garrapatas en la región, lo que plantea un reto para los investigadores ya que el dilucidar específicamente qué tipo de *Rickettsia* está circulando, cuál es su hospedero amplificador y su vector, aporta de manera significativa a la epidemiología de

la rickettsiosis no sólo en área de estudio, si no en el país. Sumado a esto se resalta la importancia y la necesidad de realizar estudios que permitan el fortalecimiento del conocimiento del personal asistencial de hospitales y centros de salud, así como la participación mancomunada de entes regionales y nacionales, con el fin de fortalecer el diagnóstico, manejo y tratamiento de esta zoonosis de interés en salud humana y animal (268).

En el intento de ahondar en el conocimiento sobre el papel que cumple *A. patinoi* en la epidemiología de la rickettsiosis se realizaron ensayos de infección experimental con *R. rickettsii* y se demostró la competencia vectorial de esta especie de garrapata en la perpetuación transtadial y transovarial. Además, que estableció que, si bien esta garrapata es competente, es necesario un hospedero amplificador que permita el mantenimiento del patógeno en condiciones naturales. (Ver detalle Anexo 5).

Para que la transmisión de patógenos en garrapatas sea efectiva, estos deben superar diversas barreras encontradas en intestino, hemolinfa, ovarios (en la transmisión transovarial) y las glándulas salivales (172), así como los diferentes componentes del sistema inmune (173), lo cual está directamente relacionado con la competencia vectorial en estos artrópodos (11,269).

En este estudio se realizó una aproximación para indagar el efecto de la infección con *R. rickettsii* sobre el perfil de expresión de algunos genes del sistema inmune en *A. patinoi* infectado en condiciones de laboratorio. Los análisis se realizaron en ninfas (completas) y en glándulas salivales e intestino de adultos.

Se evaluó el gen que codifica para Alfa-macroglobulina, este es un inhibidor de proteasas involucrado en procesos de fagocitosis en garrapatas, se considera como una especie de opsonina, ya que el mecanismo de inhibición lo realiza por medio de endocitosis mediada por receptores (270). La participación de esta molécula en la fagocitosis de patógenos invasores no está del todo elucidada (270), Estudios realizados en glándula salival de *A. aureolatum* encontraron que esta proteína es regulada en el proceso infeccioso con *R. rickettsii*, posiblemente cumpliendo su función en la inhibición de este patógeno (179).

Las macroglobulinas son miembros de las familias de proteínas que contienen tiodiester (271), estudios realizados por Buresona *et al.*, 2011 demostraron que al reprimir la expresión de alfa-macroglobulina en *Ixodes ricinus* se disminuye la fagocitosis de *Chryseobacterium indologenes* en condiciones de laboratorio (271). Estos hallazgos indican que esta proteína

cumple un papel importante en el proceso de infección en garrapatas, y por lo tanto se puede inferir que su represión da lugar a que los patógenos se puedan replicar de forma adecuada en los órganos de las garrapatas; Además es consistente con los datos obtenidos en este estudio, donde se observó que durante el proceso de infección con *R. rickettsii* la expresión del gen se reprimió significativamente en ninfas de *A. patinoi*, pero no se observó cambios en intestino ni en glándula salival, donde se expresa pero no se modula tras la infección.

Por otra parte, la microplusina es un péptido antimicrobiano reportado inicialmente en *Rh. microplus*, es una proteína bien caracterizada perteneciente a la familia de péptidos antimicrobianos ricos en cisteína; pertenece al arsenal de moléculas del sistema inmune innato de garrapatas y actúa frente a la infección por bacterias y hongos (272)

Se ha establecido que la microplusina es reprimida en glándula salival de *A. aureolatum* infectada con *R. rickettsii* (179). En este estudio realizado con *A. patinoi*, esta microplusina no fue detectada en glándula salival ni intestino, pero sí en ninfas donde también se observó una represión estadísticamente significativa. Así mismo se observó que el gen que codifica para el péptido antimicrobiano también fue reprimido. Los péptidos antimicrobianos son proteínas que están involucradas en el control de crecimiento microbiano en garrapatas. Estudios realizados con *A. sculptum* reportaron que este gen es altamente regulado cuando la garrapata está infectada con *R. rickettsii* (13). lo que es concordante con la biología de esta especie caracterizada por tener bajos porcentajes de infección con *R. rickettsii* en condiciones naturales (273).

Otro gen probado fue el que codifica la peritrofina componente importante de la matriz peritrófica de garrapatas encargado de proteger al intestino de agentes patógenos. Estudios realizados en *I. scapularis* evidenciaron que al reprimir la peritrofina, se altera el grosor de la matriz peritrófica, permitiendo de esta forma la colonización del intestino con patógenos como *Borrelia burgdorferi*, agente causal de la enfermedad de Lyme (274). En *A. sculptum* la expresión del gen que codifica esta molécula es reprimida durante la infección por *R. rickettsii* (178). Con *A. patinoi* se observó una ligera expresión en ninfas, pero no hubo expresión en intestino, indicando con esto que si bien *R. rickettsii* logra infectar el intestino de la garrapata, en cierta medida se inhibe su replicación, lo cual puede verse evidenciado en los porcentajes de infección observado en ninfas (Ver anexo 5), donde no todos los ejemplares son eficientemente infectados. Sin embargo, es importante realizar más ensayos con este gen, ya que este comportamiento no fue observado en todos los especímenes testados

Con estos resultados se pudo establecer el efecto de la infección de *R. rickettsii* sobre el perfil de expresión de algunos genes del sistema inmune en *A. patinoi*, soportando con esto el efecto patogénico de la bacteria sobre la garrapata previamente documentado. *R. rickettsii* actúa reprimiendo la expresión de genes que codifican para moléculas y proteínas que intervienen en la inhibición de la replicación de patógenos, por lo tanto logra replicarse en sus órganos, para posteriormente hacer efectiva su transmisión a hospederos susceptibles, lo que se presume pasa de la misma manera en condiciones naturales

No obstante una explicación asociada a las bajas tasas de infección en condiciones naturales, es debido a la colonización de la garrapata con microorganismos simbiotes, ya que estos son un factor importante en la mediación de la colonización y supervivencia de patógenos y en el caso de las rickettsias, una *Rickettsia* simbiote no patógena puede inhibir la colonización de una segunda patógena (274).

Es importante realizar estudios más robustos con análisis bioinformáticos avanzados donde se indague sobre todo el perfil de expresión de esta garrapata, especialmente enfocados en su caracterización funcional ya que son hallazgos importantes que pueden considerarse como blancos en el desarrollo de estrategias para controlar los patógenos transmitidos por garrapatas así como la proliferación de estos vectores.

7 CONCLUSIONES

Se determinó la seroprevalencia de rickettsias transmitidas por garrapatas en humanos y animales domésticos en las zonas seleccionadas en el estudio.

Se identificaron rickettsias asociadas a pulgas, presentes en garrapatas, sin embargo son necesarios otros estudios que soporten este hallazgo.

Se comprobó por técnicas moleculares la circulación de *A. patinoi* en la zona de estudio.

Se estableció que rickettsias transmitidas por garrapatas, podrían estar implicadas en síndromes febriles en Santander de Quilichao.

Se estableció la competencia vectorial de *A. patinoi* en la transmisión de *R. rickettsii* a hospederos susceptibles

Se identificó genes del sistema inmune de garrapatas implicados en el control de patógenos, siendo reprimidos por la infección con *R. rickettsii*.

Con todos estos resultados, se rescatan muchos datos importantes para el abordaje de esta zoonosis en el Cauca, aun así queda la puerta abierta para muchos otros estudios de mayor envergadura que investiguen más a fondo cada uno de los factores que intervienen en esta problemática.

8 RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES

Se recomienda realizar estudios de seroprevalencia en la región con diferentes antígenos de *Rickettsia*, con el fin de establecer específicamente cuál especie o especies, podrían estar circulando.

Debido a problemas varios las muestras de DNA se degradaron y no fue posible secuenciar un mayor número de pools de garrapatas para establecer qué otra especie de *Rickettsia* podría estar circulando, por tanto se recomienda ahondar este aspecto para poder correlacionar con la seroprevalencia en humanos y animales.

Se recomienda realizar estudios con mamíferos silvestres especialmente en la zona de la frontera entre el municipio de La Sierra y El tambo, en la zona cercana a la vereda Juana Castaña, Quilcacé y la Alianza.

Se recomienda realizar estudios robustos de bioinformática donde se evalúen todo el perfil génico de esta especie de garrapata.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Webster JP, Gower CM, Knowles SCL, Molyneux DH, Fenton A. One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol Appl*. 2015;9(2):313–33.
2. Rosenberg, Petersen; Lindsey, Nicole Fischer M et. al. Vital Signs: Trends in Reported Vectorborne Disease Cases — United States and Territories, 2004–2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2018;67(17):496–501.
3. Brites-Neto J, Duarte KMR, Martins TF. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Vet World*. 2015;8:301-315.
4. Rar V, Golovljova I. Anaplasma, Ehrlichia, and “ Candidatus Neoehrlichia” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;11:1842–61.
5. Kulkarni MA, Berrang-Ford L, Buck PA, Drebot MA, Lindsay LR, Ogden NH. Major emerging vector-borne zoonotic diseases of public health importance in Canada. *Emerg Microbes Infect*. 2015;4(6):e33.
6. Francischetti, Ivo MB. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14:2051–88.
7. Mans BJ, Neitz AWH. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: Evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34(1):1–17.
8. Qiu Y, Nakao R, Ohnuma A, Kawamori F, Sugimoto C. Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One*. 2014;9:e10396.
9. de la Fuente J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, et al. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:1–13.
10. Papa A, Tsioka K, Kontana A, Papadopoulos C, Giadinis N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8(1):31–5.
11. Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(236):1–14.
12. Abraham NM, Liu L, Jutras BL, Yadav AK, Narasimhan S, Gopalakrishnan V, et al. Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(5):781–90.

13. Martins LA, Galletti MFB de M, Ribeiro JM, Fujita A, Costa FB, Labruna MB, et al. The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(129):1–13.
14. Santucci LA, Gutierrez PL, Silverman DJ. *Rickettsia rickettsii* induces superoxide radical and superoxide dismutase in human endothelial cells. *Infect Immun*. 1992;60(12):5113–8.
15. Devamanoharan PS, Santucci LA, Hong JE, Tian X, Silverman DJ. Infection of human endothelial cells by *Rickettsia rickettsii* causes a significant reduction in the levels of key enzymes involved in protection against oxidative injury. *Infect Immun*. 1994;62(6):2619–21.
16. Galletti MFBM, Fujita A, Nishiyama MY, Malossi CD, Pinter A, Soares JF, et al. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector. *PLoS One*. 2013;8:e77388.
17. Renvoisé A RD. An update on rickettsiosis. *Med Mal Infect*. 2009;39(2):71–81.
18. Faccini-Martínez ÁA, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA. Syndromic classification of rickettsioses: An approach for clinical practice. 2014;28:126–39.
19. Parola P, Raoult D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans : An Emerging Infectious Threat. *Ticks Tick Borne Dis*. 2001;32:897–928.
20. Patino L, Afanador A, Paul JH. A Spotted Fever in Tobia, Colombia: Preliminary Report. *American Journal of Tropical Medicine*. 1937;17:639–53.
21. Acosta J, Urquijo L, Díaz A, Sepúlveda M, Mantilla G, Heredia D, et al. Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero-marzo de 2006. *Instituto Nacional de Salud*. 2006;11:177-186.
22. Pacheco O, Giraldo R, Hidalgo M, Galeano A, Echeverry I, Echevarria L. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Instituto Nacional de Salud*. 2008;13:145-156. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/>.
23. Hidalgo M, Lizarazo D, Ovalle M, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, et al. Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. *Instituto Nacional de Salud*. 2007;12:371-378.
24. Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, et al. Rocky Mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1058-1060.
25. Faccini-Martínez ÁA, Costa FB, Hayama-Ueno TE, Ramírez-Hernández A, Cortés-Vecino JA, Labruna MB, et al. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* ticks, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:537–9.
26. Rivera-Páez FA, Martins TF, Ossa-López PA, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks (Acari: Ixodidae) of domestic animals in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9:819–23.

27. Miranda J, Portillo A, Oteo J a, Mattar S. Rickettsia sp. strain colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): a new proposed Rickettsia detected in Amblyomma dissimile (Acari: Ixodidae) from iguanas and free-living larvae ticks from vegetation. J Med Entomol. 2012;49:960–5.
28. Londoño AF, Díaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M, et al. Infection of Amblyomma ovale by Rickettsia sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. 2014;5(6):672–5.
29. Miranda J, Mattar S. Molecular detection of rickettsia bellii and rickettsia sp. strain colombianensi in ticks from Cordoba, Colombia. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:208–12.
30. Paternina LE, Verbel D, Martínez L, Bejarano E. Agentes Rickettsiales asociados a garrapatas de zonas rurales del Departamento de Sucre, Región Caribe de Colombia. V Congreso Latinoamericano de Enfermedades Rickettsiales - Revista Biomédica. 2015;26(P7):87-88. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb1526S140>.
31. Miranda J, Contreras V, Negrete Y, Labruna MB, Mattar S. Surveillance of Rickettsia sp. infection in capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) a potential model of epidemiological alert in endemic areas. Biomedica. 2011;31:216–21.
32. Quintero JC, Londoño AF, Díaz FJ, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Rodas JD. Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia. Biomédica. 2013;33:38–51.
33. Peña-R., Yiyola; Olaya-M., Luz Adriana; Hidalgo M. Estudio Serológico y Entomológico de Rickettsiosis en dos Municipios del Departamento del Cauca - Colombia (La Sierra Y Rosas) / 2013 – 2014. Vol. 26, V Congreso Latinoamericano de Enfermedades Rickettsiales; Yucatán, México: Revista Biomédica. 2015.
34. Weber N, Trujillo-Trujillo J, Krücken J, Michl C, Hidalgo ME, Apprätz-Ippolito G, et al. Tickbite-associated chronic pruritic lesions in an Afro-descendant population in the Cauca Department, Colombia. I. Clinical features and impact on health. Int J Dermatol. 2020;59:1491–501.
35. Adrion ER, Aucott J, Lemke KW, Weiner JP. Health care costs, utilization and patterns of care following lyme disease. PLoS One. 2015;10:1–14.
36. Drexler NA, Traeger MS, McQuiston JH, Williams V, Hamilton C, Regan JJ. Medical and indirect costs associated with a rocky mountain spotted fever epidemic in Arizona, 2002-2011. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2015;93:549–51.
37. Merhej V, Angelakis E, Socolovschi C, Raoult D. Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species. Infection, Genetics and Evolution. 2014;25:122–37.
38. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. Vol. 26, Clinical Microbiology Reviews. 2013. p. 657–702.
39. Olano J. Rickettsial infections. Annals New York Academy of Sciences. 2005;1063:187-96.

40. Vélez JCQ, Hidalgo M, González JDR. Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. 2012;17:82–99.
41. Burgdorfer W, Brinton LP. Mechanisms of transovarial infections of spotted fever rickettsiae in ticks. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;266:61–72.
42. Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM. Infection and Transovarial Transmission of Rickettsiae Artificial Feeding. *Vector Borne and Zoonotic Diseases.* 2001;
43. Bleck TP. Central nervous system involvement in rickettsial diseases. *Neurol Clin.* 1999;17:801–12.
44. Fuxelius HH, Darby A, Min CK, Cho NH, Andersson SGE. The genomic and metabolic diversity of Rickettsia. *Res Microbiol.* 2007;158:745–53.
45. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. Vol. 18, *Clinical Microbiology Reviews.* 2005. p. 719–56.
46. Fournier PE, Zhu Y, Yu X, Raoult D. Proposal to create subspecies of Rickettsia sibirica and an emended description of Rickettsia sibirica. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078(597):606.
47. Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(11):724–32.
48. Ramírez-Hernández A. Identificación Molecular y Análisis de la Relación Filogenética de Especies de Rickettsias Presentes en Garrapatas Provenientes de Tres Regiones de Colombia. Universidad Nacional de Colombia; 2014.
49. Centers for Disease Control and Prevention. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) [Internet]. Tickborne Diseases of the United States. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/ticks/tickbornediseases/rmsf.html>
50. Labruna M, Mattar V. S, Nava S, Bermudez S, Venzal J, Dolz G, et al. Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal TT - Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev MVZ Córdoba.* 2011;16:2435-2457.
51. Dumler JS, Walker DH. Rocky Mountain spotted fever--changing ecology and persisting virulence. *N Engl J Med.* 2005;353:551–3.
52. Chapman AS, Bakken JS, Folk SM, Paddock CD, Bloch KC, Krusell A, et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control.* 2006;55:1–27.
53. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, et al. Fatal human infection with Rickettsia rickettsii, Yucatán, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:672–4.
54. Hun L, Cortés X, Taylor L. Molecular characterization of Rickettsia rickettsii isolated from human clinical samples and from the rabbit tick Haemaphysalis leporispalustris

collected at different geographic zones in Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;79:899–902.

55. Estripeaut D, Aramburú MG, Sáez-Llorens X, Thompson HA, Dasch GA, Paddock CD, et al. Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1763–5.
56. Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, et al. Rocky mountain spotted fever in Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;78:687–92.
57. Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1166(1):156–66.
58. Hidalgo M, Miranda J, Heredia D, Zambrano P, Vesga P, Lizarazo D, et al. Outbreak of Rocky Mountain spotted fever in Córdoba, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2011;106:117–8.
59. Venzal J, Portillo A, Estrada A, Castro O, Cabrera P, Oteo J. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(8):1493–5.
60. Bartlett JG. *Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the united states. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2004;
61. Arboleda M, Acevedo-Gutiérrez LY, Ávila A, Ospina D, Díaz FJ, Walker DH, et al. Human Rickettsiosis Caused by *Rickettsia parkeri* Strain Atlantic Rainforest, Urabá, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2020;26:3048–50.
62. Quintero Vélez JC, Faccini-Martínez AA, Rodas González JD, Díaz FJ, Ramírez García R, Somoyar Ordosgoitia P, et al. Fatal *Rickettsia rickettsii* infection in a child, Northwestern Colombia, 2017. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019;10:995–6.
63. Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012;3(5–6):271–8.
64. Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):1–3.
65. McQuiston JH, Zemtsova G, Perniciaro J, Hutson M, Singleton J, Nicholson WL, et al. Afebrile Spotted Fever Group *Rickettsia* Infection After a Bite from a *Dermacentor variabilis* Tick Infected with *Rickettsia montanensis*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12(12):1059–61.
66. Mansueto P, Vitale G, Cascio A, Seidita A, Pepe I, Carroccio A, et al. New insight into immunity and immunopathology of rickettsial diseases. *J Immunol Res*. 2012;2012:26p.
67. Walker DH, Valbuena G a, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;990(1):1–11.
68. Díaz JS, Cataño JC. Fiebre manchada de las montañas rocosas: ni tan manchada ni tan montañosa como pensábamos. *Infectio*. 2010;14(4):264–76.

69. Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging Rickettsioses: Endothelial cell infection and early disease events. Vol. 6, *Nature Reviews Microbiology*. 2008. p. 375–86.
70. Uchiyama T, Kawano H, Kusuhara Y. The major outer membrane protein rOmpB of spotted fever group rickettsiae functions in the rickettsial adherence to and invasion of Vero cells. *Microbes Infect*. 2006;8(3):801–9.
71. Chen LF, Sexton DJ. What's New in Rocky Mountain Spotted Fever? *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22(3):415–32.
72. Heinzen RA. Rickettsial actin-based motility: behavior and involvement of cytoskeletal regulators. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;990:535–47.
73. Valbuena G, Hui MF, Walker DH. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes Infect*. 2002;4(6):625–33.
74. Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of Ticks. *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22:195–215.
75. Pfäffle M, Littwin N, Muders S V., Petney TN. The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol*. 2013;43:1059–77.
76. Flicek BF. Rickettsial and Other Tick-Borne Infections. Vol. 19, *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 2007. p. 27–38.
77. Moore JJ. Time relationships of the wood-tick in the transmission of rocky mountain spotted fever. *Journal of Infectious Diseases*. 1911;8(3):339–47.
78. Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Vol. 12, *Parasitology Today*. 1996. p. 472–9.
79. Voordouw MJ. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. Vol. 142, *Parasitology*. 2015. p. 290–302.
80. Belli A, Sarr A, Rais O, Rego ROM, Voordouw MJ. Ticks infected via co-feeding transmission can transmit Lyme borreliosis to vertebrate hosts. *Sci Rep*. 2017;7:1–13.
81. Philip C. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. *Public health reports*. 1959;74:595–600.
82. Anderson JF. The natural history of ticks. *Medical Clinics of North America*. 2002;86(2):205–18.
83. Osorno Mesa E. Las Garrapatas de la República de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. 1940;IV(13):6–24.
84. Salazar CVVAGRH. Identification and prevalence of ticks (Acari, Ixodidae) in bovines in five municipalities of the Popayán plateau (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2017;30:239–47.

85. Acevedo-Gutiérrez LY, Paternina LE, Pérez-Pérez JC, Londoño AF, López G RJ. Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia, una revisión a su conocimiento en el país. *Acta biol Colomb.* 2020;25:126–39.
86. Miranda R J, Mattar V S, González Tous MC. Rickettsiosis. *Rev MVZ Cordoba.* 2017;22(supl):6118–33.
87. Dahmani M, Davoust B, Rousseau F, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O. Natural Anaplasmataceae infection in *Rhipicephalus bursa* ticks collected from sheep in the French Basque Country. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(1):18–24.
88. Ammerman NC, Swanson KI, Anderson JM, Schwartz TR, Seaberg EC, Glass GE, et al. Spotted-fever group *Rickettsia* in *Dermacentor variabilis*, Maryland. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(8):1478–81.
89. Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, et al. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *New England Journal of Medicine.* 2005;353:587–94.
90. Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. *MMWR Recomm Rep.* 2016;65(2):1–44.
91. Egizi A, Gable S, Jordan RA. *Rickettsia* spp. Infecting Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*) (Acari: Ixodidae) in Monmouth County, New Jersey. *J Med Entomol.* 2020;57:974–8.
92. Oteo JA, Nava S, Sousa R de, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista chilena de infectología.* 2014;31(1):54–65.
93. Barros-Battesti DM, Beati L, Cáceres AG, Guglielmone AA, Labruna MB, Durden LA, et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol.* 2013;13:267.
94. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:252–76.
95. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich D, Petney T, Estrada-Peña A, Horak I. *The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae).* Springer S. 2014. 730 p.
96. Guglielmone AA, Robbins RG. Hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) parasitizing humans. A global overview. Springer, Cham, Switzerland, 314 pp; 2018. 314 pp.
97. Pinter A, Dias RA, Gennari SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2004;41:324–32.

98. Abarca K, López J, Acosta-Jamett G, Lepe P, Soares JF, Labruna MB. A Third *Amblyomma* Species and the First Tick-Borne *Rickettsia* in Chile. *J Med Entomol*. 2012;49(1):219–22.
99. Mastropaolo M, Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Exp Appl Acarol*. 2011;53(4):371–5.
100. Nava S, Mangold AJ, Mastropaolo M, Venzal JM, Fracassi N, Guglielmone AA. Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Vet Parasitol*. 2011;181:301–8.
101. Fornadel CM, Smith JD, Zawada SE, Arias JR, Norris DE. Detection of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* from the Eastern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2013;13:67–9.
102. Ortega-Morales AI, Nava-Reyna E, Ávila-Rodríguez V, González-Álvarez VH, Castillo-Martínez A, Siller-Rodríguez QK, et al. Detection of *Rickettsia* spp. in *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. *Parasit Vectors*. 2019;12:1–7.
103. Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S.M., Valdés-Perezgasga, M.T., Sánchez-Ramos, F.J., López-Hernández, J., Hernández-Rodríguez, S., Ortega-Morales AI. Detección de *Rickettsia rickettsii* Brumpt (Rickettsiales: Rickettsiaceae) en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Ixodida: Ixodidae) en la Comarca Lagunera, zona reemergente de Fiebre Manchada en México. *Acta Zool Mex*. 2017;33:339–344.
104. Ulloa-García A, Dzul-Rosado K, Bermúdez-Castillero SE, López-López N, Torres-Monzón JA. Detección de *Rickettsia typhi* en *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y *Amblyomma mixtum* en el sur de México. *Salud Publica Mex*. 2020;62:358–63.
105. Cunha NC, Fonseca AH, Rezende J, Rozental T, Favacho ARM, Barreira JD, et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2010;29:105–8.
106. Monje LD, Linares MC, Beldomenico PM. Prevalence and infection intensity of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from Mendoza, Argentina. *Microbes Infect*. 2016;18(11):701–5.
107. Cicuttin GL, Vidal P, Nazarena De Salvo M, 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). *Revista chilena de infectología*. 2014;31:563–8.
108. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, et al. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med Vet Entomol*. 2011;25:148–55.
109. Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MPJ, Labruna MB, Pacheco RC, et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis*

- juxtakochi ticks in the state of São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:869–73.
110. Labruna MB, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;127:169–74.
 111. Borrás P, Sanchez J, Guillemi E, De la Fourniere S, Abadia M, Farber M, et al. Detección de bacterias de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Rickettsia* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* sl en Pergamino Argentina / Detection of Bacteria of the Genera *Ehrlichia*, *Anaplasma* and *Rickettsia* in *Rhipicephalus sanguineus* s.l Ticks in the . *Rev argent salud publica.* 2019;10:8–13.
 112. McKiel JA, Bell EJ, Lackman DB. *Rickettsia canada*: a new member of the typhus group of rickettsiae isolated from *Haemaphysalis leporispalustris* ticks in Canada. *Can J Microbiol.* 1967;13:503–10.
 113. Bermúdez SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, et al. Detection and Identification of Rickettsial Agents in Ticks From Domestic Mammals in Eastern Panama. *J Med Entomol.* 2009;46:856–61.
 114. Bermúdez CSE, Zaldivar AY, Spolidorio MG, Moraes-Filho J, Miranda RJ, Caballero CM, et al. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Vet Parasitol.* 2011;177:134–8.
 115. Gasser AM, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB. Canine Rocky Mountain spotted fever: A retrospective study of 30 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001;37:41–8.
 116. Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* 2001;17(2):74–80.
 117. Chomel B. Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat. Special Issue: Fipronil, amitraz and (S)-methoprene - a novel ectoparasiticide combination for dogs. 2011;179:294–301.
 118. Levin ML, Killmaster LF, Zemtsova GE, Ritter JM, Langham G. Clinical presentation, convalescence, and relapse of rocky mountain spotted fever in dogs experimentally infected via tick bite. *PLoS One.* 2014;9:e115105.
 119. Labruna MB, Kamakura O, Moraes-Filho J, Horta MC, Pacheco RC. Rocky mountain spotted fever in dogs, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:458–60.
 120. de Oliveira PB, Harvey T V., Fehlberg HF, Rocha JM, Martins TF, da Acosta ICL, et al. Serologic and molecular survey of *Rickettsia* spp. in dogs, horses and ticks from the Atlantic rainforest of the state of Bahia, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 2019;78:431–42.
 121. McQuiston JH, Guerra MA, Watts MR, Lawaczek E, Levy C, Nicholson WL, et al. Evidence of Exposure to Spotted Fever Group *Rickettsiae* among Arizona Dogs Outside a Previously Documented Outbreak Area. *Zoonoses Public Health.* 2011;58:85–92.

122. Melo ALT, Martins TF, Horta MC, Moraes-Filho J, Pacheco RC, Labruna MB, et al. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2011;2:213–8.
123. Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CVB, Figueira FCB, Labruna MB, et al. Characterization of Rickettsia spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. Cad Saude Publica. 2006;22(3):495–501.
124. Kidd L, Hegarty B, Sexton D, Breitschwerdt E. Molecular characterization of Rickettsia rickettsii infecting dogs and people in North Carolina. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:400–9.
125. De Lemos ERS, Machado RD, Coura JR, Guimarães MAAM, Chagas N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1996;38:427-430.
126. 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 São Paulo, Brazil. Cad Saude Publica. 2008;24:247–52.
127. Ueno TEH, Costa FB, Moraes-Filho J, Agostinho WC, Fernandes WR, Labruna MB. Experimental infection of horses with Rickettsia rickettsii. Parasit Vectors. 2016;9(499):1–11.
128. Gould DJ, Miesse ML. Recovery of a Rickettsia of the Spotted Fever Group from Microtus pennsylvanicus from Virginia. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1954;85:558–61.
129. Sánchez-Montes S, Isaak-Delgado AB, Guzmán-Cornejo C, Rendón-Franco E, Muñoz-García CI, Bermúdez S, et al. Rickettsia species in ticks that parasitize amphibians and reptiles: Novel report from Mexico and review of the worldwide record. Ticks Tick Borne Dis. 2019;10:987–94.
130. Horta MC, Moraes-Filho J, Casagrande RA, Saito TB, Rosa SC, Ogrzewalska M, et al. Experimental infection of opossums Didelphis aurita by Rickettsia rickettsii and evaluation of the transmission of the infection to ticks Amblyomma cajennense. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2009;9:109–17.
131. Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SSL, et al. Experimental infection of capybaras Hydrochoerus hydrochaeris by Rickettsia rickettsii and evaluation of the transmission of the infection to ticks Amblyomma cajennense. Vet Parasitol. 2009;161:116–21.
132. Krawczak FS, Nieri-Bastos FA, Nunes FP, Soares JF, Moraes-Filho J, Labruna MB. Rickettsial infection in Amblyomma cajennense ticks and capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) in a Brazilian spotted fever-endemic area. Parasit Vectors. 2014;7:2–7.
133. Ramírez-Hernández A, Uchoa F, Serpa MC de A, Binder LC, Souza CE, Labruna MB. Capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) as amplifying hosts of Rickettsia rickettsii to

- Amblyomma sculptum* ticks: Evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11:101463.
134. Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Wild and domestic animals likely involved in rickettsial endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8:887–94.
 135. Hidalgo M, Vesga JF, Lizarazo D, Valbuena G. Short report: A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2009;80:1029–30.
 136. Riveros-Pinilla DA, Acevedo L, Londoño AF, Góngora A. Antibodies against spotted fever group *Rickettsia* sp., in horses of the colombian Orinoquia. *RevMVZ Córdoba.* 2015;20(Supl):5004–13.
 137. Miranda J, Contreras V, Negrete Y, Labruna MB, Mattar S. Vigilancia de la infección por *Rickettsia* sp. en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) un modelo potencial de alerta epidemiológica en zonas endémicas. *Biomédica.* 2011;31:216–21.
 138. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2000;64:115–37.
 139. Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:179–86.
 140. Carmichael JR, Fuerst P a. Molecular Detection of *Rickettsia bellii* , *Rickettsia montanensis* , and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* Tick from Nature. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2010;10(2):111–5.
 141. Occi J, Egizi AM, Goncalves A, Fonseca DM. New Jersey-Wide Survey of Spotted Fever Group *Rickettsia* (Proteobacteria: Rickettsiaceae) in *Dermacentor variabilis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodida: Ixodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2020;103:1009–16.
 142. Hecht JA, Allerdice MEJ, Dykstra EA, Mastel L, Eisen RJ, Johnson TL, et al. Multistate Survey of American Dog Ticks (*Dermacentor variabilis*) for *Rickettsia* Species. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2019;19:652–7.
 143. Kakumanu ML, Ponnusamy L, Sutton H, Meshnick SR, Nicholson WL, Apperson CS. Prevalence of *Rickettsia* Species (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Dermacentor variabilis* Ticks (Acari: Ixodidae) in North Carolina. *J Med Entomol.* 2018;55:1284–1281.
 144. Wood H, Dillon L, Patel SN, Ralevski F. Prevalence of *Rickettsia* species in *Dermacentor variabilis* ticks from Ontario, Canada. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:1044–6.
 145. Luedtke BE, Shaffer JJ, Monrroy E, Willicott CW, Bourret TJ. Molecular Detection of Spotted Fever Group *Rickettsiae* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Collected Along the Platte River in South Central Nebraska. *J Med Entomol.* 2020;57:519–23.

146. Wikswo ME, Hu R, Dasch G a, Krueger L, Arugay A, Jones K, et al. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in Dermacentor species from southern California. *J Med Entomol.* 2008;45:509–16.
147. Francis L, Paddock CD, Dykstra EA, Karpathy SE. Rickettsia and Anaplasma species in Dermacentor andersoni ticks from Washington. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11:101422.
148. Dykstra EA, Oltean HN, Kangiser D, Marsden-Haug N, Rich SM, Xu G, et al. Ecology and epidemiology of tickborne pathogens, Washington, USA, 2011–2016. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:648–57.
149. Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. Lethal effect of Rickettsia rickettsii on its tick vector (Dermacentor andersoni). *Appl Environ Microbiol.* 1999;
150. Ribeiro CM, Carvalho JLB De, Bastos PADS, Katagiri S, Batalha EY, Okano W, et al. Prevalence of Rickettsia rickettsii in Ticks: Systematic Review and Meta-Analysis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2021;21:557–65.
151. Martínez-Caballero A, Moreno B, González C, Martínez G, Adames M, Pachar J V., et al. Descriptions of two new cases of Rocky Mountain spotted fever in Panama, and coincident infection with Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus sanguineus s.l. in an urban locality of Panama City, Panama. *Epidemiol Infect.* 2018;146:875–8.
152. Foley J, Tinoco-Gracia L, Rodriguez-Lomelí M, Estrada-Guzmán J, Fierro M, Mattar-Lopez E, et al. Unbiased assessment of abundance of rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks, canine exposure to spotted fever group rickettsia, and risk factors in Mexicali, México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2019;101:22–32.
153. Peniche-Lara G, Jimenez-Delgadillo B, Dzul-Rosado K. Rickettsia rickettsii and Rickettsia felis infection in Rhipicephalus sanguineus ticks and Ctenocephalides felis fleas co-existing in a small city in Yucatan, Mexico. Vol. 40, *Journal of Vector Ecology.* 2015. p. 422–4.
154. Eremeeva ME, Zambrano ML, Anaya L, Beati L, Karpathy SE, Santos-Silva MM, et al. Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus ticks, Mexicali, Mexico. *J Med Entomol.* 2011;48:418–21.
155. Silva AB, Duarte MM, da Costa Cavalcante R, de Oliveira SV, Vizzoni VF, de Lima Duré Alí, et al. Rickettsia rickettsii infecting Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. *Acta Trop.* 2017;173:30–3.
156. Wikswo ME, Renjie HU, Metzger ME, Eremeeva ME. Detection of Rickettsia rickettsii and Bartonella henselae in Rhipicephalus sanguineus ticks from California. *J Med Entomol.* 2007;44:158–62.
157. Montenegro DC, Bitencourth K, de Oliveira S V., Borsoi AP, Cardoso KM, Sousa MSB, et al. Spotted fever: Epidemiology and vector-rickettsia-host relationship in Rio de Janeiro state. *Front Microbiol.* 2017;8:1–10.

158. Castillo- Martínez A, Cueto-Medina SM, Hernández-Rodríguez S, Gallegos-Robles MÁ, Valdés-Perezgasga MT, Sánchez-Ramos FJ, et al. Detección de *Rickettsia* sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS)*. 2015;31:80–3.
159. DE RODANICHE EC. Natural infection of the tick, *Amblyomma cajennense*, with *Rickettsia rickettsii* in Panama. *Am J Trop Med Hyg*. 1953;2:696–9.
160. Guedes E, Leite RC, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:841–5.
161. Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:523–9.
162. 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.
163. Oliveira KA, Pinter A, Medina-Sanchez A, Boppana VD, Wikel SK, Saito TB, et al. *Amblyomma imitator* ticks as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1282–4.
164. Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Moraes-Filho J, et al. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:829–34.
165. Soares JF, Soares HS, Barbieri AM, Labruna MB. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Med Vet Entomol*. 2012;26:139–51.
166. Guedes E, Leite RC, Pacheco RC, Silveira I, Labruna MB. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 2011;20:308–11.
167. Dzul-Rosado K, Peniche-Lara G, Tello-Martín R, Zavala-Velázquez J, Pacheco R de C, Labruna MB, et al. *Rickettsia rickettsii* isolation from naturally infected *Amblyomma parvum* ticks by centrifugation in a 24-well culture plate technique. *Open Vet J*. 2013;3:101–5.
168. Tarragona EL, Cicuttin GL, Mangold AJ, Mastropaolo M, Nazarena De Salvo M, Nava S. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015;
169. Tarragona EL, Soares JF, Costa FB, Labruna MB, Nava S. Vectorial competence of *Amblyomma tonelliae* to transmit *Rickettsia rickettsii*. *Med Vet Entomol*. 2016;30:410–5.
170. Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Pacheco RC, Cançado PHD, Labruna MB. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia*

- rickettsii, using experimentally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:29–36.
171. Nuttall PA, Labuda M. Tick-host interactions: Saliva-activated transmission. Vol. 129, *Parasitology.* 2004. p. S177-189.
 172. Hajdušek O, Šíma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, et al. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:1–15.
 173. Fogaça AC, Sousa G, Pavanelo DB, Esteves E, Martins LA, Urbanová V, et al. Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. *Front Immunol.* 2021;12:628054.
 174. Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* 2004;198:169–84.
 175. Sonenshine DE, Hynes WL. Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in Bioscience.* 2008;13:1–21.
 176. Kopáček P, Hajdušek O, Burešová V, Daffre S. Tick innate immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2010;708:137–62.
 177. Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:1–5.
 178. Esteves E, Maruyama SR, Kawahara R, Fujita A, Martins LA, Righi AA, et al. Analysis of the Salivary Gland Transcriptome of Unfed and Partially Fed *Amblyomma sculptum* Ticks and Descriptive Proteome of the Saliva. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;
 179. Martins LA, Malossi CD, Galletti MFB, Ribeiro JM, Fujita A, Esteves E, et al. The transcriptome of the salivary glands of *Amblyomma aureolatum* reveals the antimicrobial peptide microplusin as an important factor for the tick protection against *Rickettsia rickettsii* infection. *Front Physiol.* 2019;10:1–13.
 180. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Resultados Censo Nacional de Población y Vivienda 2018. Popayán, Cauca. 2018. p. 1-33. <https://www.dane.gov.co/files/censo2018/info>.
 181. Banca de Desarrollo Territorial. Cauca. 2019. p. 1-40. <http://www.colombialider.org/wp-content/uplo>.
 182. Departamento del Cauca. Gobernación del Cauca. Fondo para el Financiamiento del Sector Agropecuario, FINAGRO. Instituto Geográfico Agustín Codazzi.
 183. Web page [Internet]. Departamento del Cauca. 2011 [cited 2017 Dec 2]. Available from: <http://regionpacifica-moni.blogspot.com.co/2011/05/departamento-del-cauca.html>
 184. de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vallejo A. WinEpi : Working in epidemiology. An online epidemiological tool. Working in epidemiology. An online epidemiological tool. ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns (Australia), August 6-11 2006. Theme 4 - Tools & training for epidemiologists.

185. Martínez Díaz HC, Gil-Mora J, Betancourt-Ruiz P, Silva-Ramos CR, Matiz-González JM, Villalba-Perez MA, et al. Molecular detection of tick-borne rickettsial pathogens in ticks collected from domestic animals from Cauca, Colombia. *Acta Trop.* 2023 Feb;238:106773.
186. Barros DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical : um guia ilustrado para identificação de espécies. In: Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases-ICTTD. 2006. p. 223.
187. Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Brigham Young University Science Bulletin-Biological Series.* 1972;17:1–40.
188. Ramírez-Hernández A, Montoya V, Martínez A, Pérez JE, Mercado M, De La Ossa A, et al. Molecular detection of *rickettsia felis* in different flea species from caldas, colombia. 2013;89(3):453–9.
189. Du Breuil RM, Patel JM, Mendelow B V. Quantitation of β -actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *Genome Res.* 1993;3:57–9.
190. Hall T. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 / 98 / NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–8.
191. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547–9.
192. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol.* 1992;9:678–87.
193. Nei M. and Kumar. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York. 2000;
194. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16:111–20.
195. Mangold AJ, Barges MD, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 1998;84:478–84.
196. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3:294–9.
197. Zahler M, Gothe R, Rinder H. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). *Int J Parasitol.* 1995;25:1413–9.
198. McLain DK, Wesson DM, Oliver JH, Collins FH. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 1995;32:353–60.
199. Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990;28:530–4.

200. 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 São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol.* 2004;42:90–8.
201. 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;50:1449–55.
202. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23:2947–8.
203. Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo EP, et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol.* 2004;41:1073–81.
204. Speck S, Perseke L, Petney T, Skuballa J, Pfäffle M, Taraschewski H, et al. Detection of *Rickettsia helvetica* in ticks collected from European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*, Linnaeus, 1758). *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:222–6.
205. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25:402–8.
206. Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, et al. Etiology and epidemiological characterization of non-malarial febrile syndrome in three municipalities of Urabá (Antioquia), Colombia. *Biomedica.* 2013;33 Suppl 1:99–107.
207. Miranda J, Sánchez L, Amaya K, Mattar V S. Primera prueba serológica de *Rickettsiasp.* del grupo de la fiebre manchada en el departamento del Meta. *Biomedica.* 2011;31 (suplem:105).
208. Miranda A.F. MS. Alta seroprevalencia de rickettsiosis en trabajadores del campo en el municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba. *IQEN.* 2002;7:72–5.
209. Hidalgo M, Sánchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker D, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group rickettsiae in a rural area of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2007;77:378-380.
210. Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castaneda E, Galeano A, Puerta H, et al. Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial and leptospiral exposure in Colombia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2009;9:483–90.
211. Ríos R, Franco S, Mattar S, Urrea M, Tique V. Seroprevalencia de *Leptospira sp.*, *Rickettsia sp.* *Ehrlichia sp.* en trabajadores rurales del departamento de Sucre, Colombia. *Infectio.* 2008;12:319–24.
212. Arrieta-Hernández N, Salgado-Mercado A, Paternina LE, Martínez L, Vertel-Morinson M, Paternina-Gómez M, et al. Seroprevalencia a *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas, en población humana de zona rural del municipio de Toluviéjo , Colombia. *Revista de Investigaciones en Medicina Tropical.* 2015;1:8–13.
213. Ortiz J, Miranda J, Ortiz L, Navarro Y, Mattar S. Seroprevalencia de *Rickettsia sp.* en indígenas Wayuü de la Guajira y Kankuamos del Cesar, Colombia. *Infectio.* 2015;19:18–23.

214. Barrera S, Martínez S, Tique-Salleg V, Miranda J, Guzmán C, Mattar S. Seroprevalencia de Hantavirus, Rickettsia y Chikungunya en población indígena del municipio de Tuchín, Córdoba. *Infectio*. 2015;19:75–82.
215. Londoño AF, Acevedo-Gutiérrez LY, Marín D, Contreras V, Díaz FJ, Valbuena G, et al. Human prevalence of the spotted fever group (SFG) rickettsiae in endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;77:378–80.
216. Pérez JE, Estrada GI, Zapata Y, Hidalgo M, Serna CC, Castro DC, et al. Frecuencia de anticuerpos y seroconversión frente a Rickettsia spp. en pacientes atendidos en instituciones de salud del departamento de Caldas, Colombia, 2016-2019. *Biomédica*. 2021;41:103–17.
217. De Lemos ERS, Alvarenga FBF, Cintra ML, Ramos MC, Paddock CD, Ferebee TL, et al. Spotted fever in Brazil: A seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65:329–34.
218. Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, et al. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;61:350–4.
219. Zavala-Velazquez JE, Ruiz-Sosa J, Vado-Solis I, Billings AN, Walker DH. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatan: Evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;61:405–8.
220. Del Guercio VMF, Rocha MMM, Melles HHB, Lima VCL de, Pignatti MG. Febre maculosa no município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30:47–52.
221. Weitzel T, Acosta-Jamett G, Jiang J, Martínez-Valdebenito C, Farris CM, Richards AL, et al. Human seroepidemiology of Rickettsia and Orientia species in Chile – A cross-sectional study in five regions. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020;11:101503.
222. Bermúdez SE, Lyons CR, García GG, Zaldívar YL, Gabster A, Arteaga GB. Serologic evidence of human rickettsia infection found in three locations in Panamá. *Biomedica*. 2013;33:31–7.
223. Quintero V. JC, Paternina T. LE, Uribe Y. A, Muskus C, Hidalgo M, Gil J, et al. Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:1–19.
224. Wallace JW, Nicholson WL, Perniciaro JL, Vaughn MF, Funkhouser S, Juliano JJ, et al. Incident Tick-Borne Infections in a Cohort of North Carolina Outdoor Workers. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2016;16:302–8.
225. Salmon-Mulanovich G, Simons MP, Flores-Mendoza C, Loyola S, Silva M, Kasper M, et al. Seroprevalence and risk factors for rickettsia and leptospira infection in Four Ecologically Distinct Regions of Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2019;100:1391–400.

226. Poubel IT, Cunha NC, Fonseca ABM, Pinter A, Fonseca AH, Cordeiro MD, et al. Seroprevalence of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in dogs during a Brazilian Spotted Fever outbreak in the State of Rio de Janeiro. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2018;70:667–74.
227. Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MCB, Gennari SM, Galvão MAM, 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 São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever gro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2004;77:93–7.
228. Moraes-Filho J, Pinter A, Pacheco RC, Gutmann TB, Barbosa SO, Gonzáles MARM, et al. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2009;9:73–8.
229. Souza ZÊS, Moraes B V., Krawczak FS, Zulzke L, Carvalho T V., Sousa AO, et al. Detection of Anti-*Rickettsia Rickettsii* Antibodies in Dogs Living in a Neglected Area in São Paulo, SP, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2020;72(6).
230. López Del P J, Abarca V K, Azócar A T. Clinical and serological evidence of canine rickettsiosis in Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2007;24:189–93.
231. Tomassone L, Conte V, Parrilla G, De Meneghi D. *Rickettsia* infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* Ticks, Cochabamba Department, Bolivia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2010;10:953–8.
232. Souza CE, Camargo LB, Pinter A, Donalisio MR. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. *PLoS One.* 2016;11:e0153303.
233. Medeiros AP, Moura AB, Souza AP, Bellato V, Sartor AA, Vieira-Neto A, et al. Antibodies against rickettsiae from spotted fever groups in horses from two mesoregions in the state of Santa Catarina, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2013;65:1713–9.
234. de Oliveira GMB, da Silva IWG, da Cruz Ferreira Evaristo AM, de Azevedo Serpa MC, Silva Campos AN, Dutra V, et al. Tick-borne pathogens in dogs, wild small mammals and their ectoparasites in the semi-arid Caatinga biome, northeastern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11:101409.
235. Sangioni LA, Horta MC, Vianna MCB, Gennari SM, Soares RM, Galvão MAM, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:265–70.
236. Freitas MCD de O, Grycajuk M, Molento MB, Bonacin J, Labruna MB, Pacheco R de C, et al. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria.* 2010;19:130–1.
237. Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: Clinical and laboratory findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(7):696–701.

238. Schmidt PL. Companion Animals as Sentinels for Public Health. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 2009;39:241–50.
239. Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Perez JE, Castaño-Villa GJ, Ossa-López PA, et al. Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9:57-66. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.1>.
240. Troyo A, Moreira-Soto RD, Calderon-Arguedas Ó, Mata-Somarribas C, Ortiz-Tello J, Barbieri A, et al. Detection of rickettsiae in fleas and ticks from areas of Costa Rica with history of spotted fever group rickettsioses. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016;7:1128–34.
241. Vecino JAC, Echeverri JAB, Cárdenas JA, Herrera LAP. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2010;
242. Tabor AE, Ali A, Rehman G, Garcia GR, Zangirolamo AF, Malardo T, et al. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: A review of resistant and susceptible host responses. Vol. 7, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017. p. 1–18.
243. Pesquera C, Portillo A, Palomar AM, Oteo JA. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasit Vectors*. 2015;8:1–10.
244. Moura-Martiniano NO, Machado-Ferreira E, Cardoso KM, Gehrke FS, Amorim M, Fogaça AC, et al. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:498–500.
245. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*. 2010;3:1–11.
246. Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:1–9.
247. Louly CCB, Fonseca IN, De Oliveira VF, Linhares GFC, De Menezes LB, Borges LMF. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. *Ciencia Rural*. 2007;37:464–9.
248. Silveira JAG, Passos LMF, Ribeiro MFB. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol*. 2009;161:270–5.
249. Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol*. 2006;
250. Jacobs PAH, Fourie LJ, Kok DJ, Horak IG. Diversity, seasonality and sites of attachment of adult ixodid ticks on dogs in the central region of the Free State Province, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2001;68:281–90.
251. Monje LD, Linares MC, Beldomenico PM. Prevalence and infection intensity of *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks from Mendoza, Argentina. *Microbes Infect*. 2016;18(11):701–5.

252. Cicuttin GL, Vidal P, Nazarena De Salvo M, 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). *Revista chilena de infectología*. 2014;31:563–8.
253. Bermúdez SE, Castro AM, Trejos D, García GG, Gabster A, Miranda RJ, et al. Distribution of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007–2013). *Ecohealth*. 2016;13:274–84.
254. de Oliveira JC, Reckziegel GH, do Nascimento Ramos CA, Giannelli A, Alves LC, de Carvalho GA NRR. Detection of *Rickettsia felis* in ectoparasites collected from domestic animals. *Exp Appl Acarol*. 2020;81:255–64.
255. Lopes Vieira AM, de Souza CE, Labruna MB, Caporalle Mayo R, Lacerra de Souza SS F de CN. *Manual de Vigilancia Acarológica do Estado de São Paulo*. 2002. p. 1–60.
256. Díaz-Sánchez AA, Chilton NB, Roblejo-Arias L, Fonseca-Rodríguez O, Marrero-Perera R, Diyes CP, et al. Molecular detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from horses in Cuba. *Med Vet Entomol*. 2021;35:207–12.
257. Santodomingo A, Sierra-Orozco K, Cotes-Perdomo A, Castro LR. Molecular detection of *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys* and *Theileria equi* in ticks collected from horses in Tayrona National Park, Colombia. *Exp Appl Acarol*. 2019;77:411–23.
258. Tyrrell JD, Qurollo BA, Tornquist SJ, Schlaich KG, Kelsey J, Chandrashekar R, et al. Molecular identification of vector-borne organisms in Ehrlichia seropositive Nicaraguan horses and first report of *Rickettsia felis* infection in the horse. *Acta Trop*. 2019;200:105170.
259. Low V, Prakash B, Tan T, Sofian-Azirun M, Anwar F, Vinnie-Siow W, et al. Pathogens in ectoparasites from free-ranging animals: Infection with *Rickettsia asembonensis* in ticks, and a potentially new species of *Dipylidium* in fleas and lice. *Vet Parasitol*. 2017;245:102-105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.001>.
260. Dall’Agnol B, Souza U, Webster A, Weck B, Stenzel B, Labruna M, et al. “Candidatus *Rickettsia asemboensis*” in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Brazil. *Acta Trop*. 2017;167:18-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropic.2017.04.001>.
261. Kocher C, Morrison AC, Leguia M, Loyola S, Castillo RM, Galvez HA, et al. Rickettsial Disease in the Peruvian Amazon Basin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:1-13.
262. Acevedo-Gutiérrez LY, Paternina LE, Labruna MB, Rodas JD. Presence of two species of the *Amblyomma cajennense* complex (Acari: Ixodidae) and probable zones of sympatry in northwestern Colombia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2021;12:101815.
263. Quintero V JC, Mignone J, Osorio Q L, Cienfuegos-Gallet A V., Rojas A C. Housing conditions linked to tick (Ixodida: Ixodidae) infestation in rural areas of Colombia: A potential risk for rickettsial transmission. *J Med Entomol*. 2021;58:439–49.
264. Costa FB, Gerardi M, Binder LDC, Benatti HR, Serpa MCDA, Lopes B, et al. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting *Amblyomma sculptum* (Acari:

- Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil. *J Med Entomol.* 2020;57:308–11.
265. Rivas JJ, Moreira-Soto A, Alvarado G, Taylor L, Calderón-Arguedas O, Hun L, et al. Pathogenic potential of a Costa Rican strain of “Candidatus *Rickettsia amblyommii*” in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6:805–11.
266. Arroyave E, Londoño AF, Quintero JC, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Díaz FJ, et al. Etiología y caracterización epidemiológica del síndrome febril no palúdico en tres municipios del Urabá antioqueño, Colombia. *Biomedica.* 2013;33:99–107.
267. Faccini-Martínez ÁA, Ramírez-Hernández A, Barreto C, Forero-Becerra E, Millán D, Valbuena E, et al. Epidemiology of spotted fever group rickettsioses and acute undifferentiated Febrile Illness in Villeta, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2017;9:782–8.
268. Walker DH. Los desafíos en el diagnóstico , la investigación y la concientización sobre las rickettsiosis en América Latina. *Acta Médica Costarricense.* 2013;5:4–6.
269. Casadevall A, Pirofski L a. Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. *Infect Immun.* 2000;68(12):6511–8.
270. Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Sojka D KP. IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Dev Comp Immunol.* 2009;33:489–98.
271. Buresova V, Hajdusek O, Franta Z, Loosova G, Grunclova L, Levashina EA, et al. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun.* 2011;3:623–30.
272. Silva FD, Rezende CA, Rossi DCP, Esteves E, Dyszy FH, Schreier S, et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284:34735–46.
273. Gerardi M, Ramírez-Hernández A, Binder LC, Krawczak FS, Gregori F, Labruna MB. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii*. *Front Physiol.* 2019;10:1–12.
274. Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, et al. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe.* 2014;15:58–71.

10. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado humanos

Este consentimiento fue elaborado de acuerdo con los artículos 15 y 16 de la resolución 08430 de 1993. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.



Anexo 1.

Proyecto: Estudio de enfermedades transmitidas por vectores: Garrapatas, pulgas y piojos, en zonas priorizadas del departamento de Cauca. Acercamiento a la vigilancia y al control.

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA APLICACIÓN DE ESTUDIO DE CAMPO – HUMANOS

Información sobre el Estudio

Válido desde el 1 de enero de 2017 hasta el 31 de diciembre del 2019

Lo invitamos a que haga parte del estudio de investigación titulado "Estudio de enfermedades transmitidas por vectores: Garrapatas, pulgas y piojos, en el departamento de Cauca. Acercamiento a la vigilancia y al control" que estamos realizando la Universidad de la Salle, La Pontificia Universidad Javeriana y la secretaria de Salud del Cauca para aportar a la construcción de estrategias de gestión del riesgo de enfermedades transmitidas por garrapatas, pulgas y piojos en poblaciones humanas y animales de localidades priorizadas de los municipios de El Tambo, La Sierra, Caloto y Santander de Quilichao del departamento del Cauca, Colombia a partir de métodos participativos con las comunidades y autoridades, y métodos de campo y laboratorio, para el entendimiento de los factores que determinan su ocurrencia y eco-epidemiología. Su decisión de tomar parte en esto es enteramente voluntaria. Por favor lea este formulario de consentimiento cuidadosamente y haga cuantas preguntas considere, antes de decidir si quiere participar. Si usted decide participar podrá abandonar el estudio en cualquier momento sin perder algún beneficio que pudiera tener. Este consentimiento se va a diligenciar por duplicado y se le entregara una de las copias

Propósito del estudio

Aportar a la construcción de estrategias de gestión del riesgo de enfermedades transmitidas por garrapatas, pulgas y piojos en poblaciones humanas y animales de localidades priorizadas de los municipios de El Tambo, La Sierra, Caloto y Santander de Quilichao del departamento del Cauca, Colombia, a partir de métodos participativos con las comunidades y autoridades, y métodos de campo y laboratorio, para el entendimiento de los factores que determinan su ocurrencia y eco-epidemiología.

Procedimiento del estudio

Usted será contactado por un profesional de la salud que hace parte del grupo de investigación de la propuesta quien le entregará este formulario, una vez haya aceptado la participación en el estudio, entonces:

Como participante voluntario en este estudio usted estará dispuesto a colaborar en:

1. Toma de muestra: Le será realizada una toma de muestra de sangre venosa de 10 centímetros cúbicos aproximadamente uno con EDTA o anticoagulante y otro tubo seco, por parte de uno de los investigadores del proyecto. Este procedimiento se le explicará en detalle al momento de realizarle la punción. Lo único que puede presentar después, será un hematoma en el sitio de la punción venosa.

Las muestras de sangre serán procesadas por personal idóneo del laboratorio de bacteriología especial de la Pontificia universidad Javeriana. Con la sangre obtenida se realizará la prueba serológica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Pruebas moleculares como PCR para el reconocimiento de diferentes tipos de Bacterias, y análisis microscópico de los extendidos de sangre para la observación directa de algunas bacterias

2. Encuesta: Usted contestará una serie de preguntas relacionadas con características socio-demográficas y antecedentes personales relacionados con enfermedades transmitidas por garrapatas, piojos y pulgas



Confidencialidad

Los resultados que se obtengan de este estudio y la información sobre el estado de salud del voluntario se mantendrán de manera confidencial respetándose en todo momento su identidad. Es necesario aclarar que la participación en el estudio **no** modificará la conducta médica ni el curso de la enfermedad; sin embargo, usted podrá conocer los resultados obtenidos en su muestra oportunamente.

Su participación en este proyecto es de carácter voluntario, y en caso de no participar en él, esta decisión no afectará la relación médico – paciente.

Los resultados de investigación serán aplicados en las Líneas de Investigación de las diferentes entidades participantes, y como datos para las publicaciones que de ella surjan en un medio de divulgación estrictamente académico. En ninguno de los informes o publicaciones resultantes del proyecto de investigación se identificará el nombre del participante, con el fin de preservar en anonimato de su participación.

Los investigadores no obtendrán ningún beneficio económico de este proyecto sin su consentimiento.

Los resultados del presente estudio permitirán proponer estudios de mayor envergadura que permitirán generar recomendaciones específicas de prevención, diagnóstico y tratamiento para el personal profesional de salud, las autoridades sanitarias y la comunidad en general con el propósito de disminuir la morbilidad asociada con enfermedades transmitidas por ectoparásitos.

El consentimiento deberá ser firmado por usted o un familiar en caso de que usted no esté en condiciones físicas o mentales de expresar su consentimiento personalmente.

Si tiene alguna duda o desea saber su resultado puede comunicarse de lunes a Viernes de 8:00am a 5:00pm con la Dra. Marylin Hidalgo Investigadora en la Universidad Javeriana teléfono 3-20-83-20 extensión 4155 o con la Dra Heidy Martinez al 3125187988 o al correo electrónico h-martinez@javeriana.edu.co



Proyecto: Estudio de enfermedades transmitidas por vectores: Garrapatas, pulgas y piojos, en zonas priorizadas del departamento de Cauca. Acercamiento a la vigilancia y al control.

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA APLICACIÓN DE ESTUDIO DE CAMPO
Válido desde el 1 de enero de 2017 hasta el 31 de diciembre del 2019

Yo, _____ como sujeto del estudio me comprometo a que toda la información que brinde será ajustada a la verdad.

Declaro que estoy de acuerdo con lo anterior y que participo voluntariamente y no he sido sometido a ninguna intervención con coacción en esta decisión.

Se me ha explicado la naturaleza y el propósito de la investigación señalada y me ha informado de manera clara que puedo retirarme del estudio en cualquier momento y que recibiré trato igualitario si no participo.

Manifiesto que he sido informado sobre las normas éticas que regulan las investigaciones, que las muestras serán usadas exclusivamente para el propósito de la investigación y se manejará reservadamente los datos que se obtengan.

Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas sobre la investigación mencionada y estas han sido contestadas satisfactoriamente.

Manifiesto que he leído y comprendido perfectamente lo anterior. En constancia firmo a continuación.

Nombre: _____

Firma: _____

Cédula de Ciudadanía No. _____

Fecha: _____

HUELLA DIGITAL INDICE DERECHO (en caso de pacientes que no sepan leer ni escribir)

Testigos:

Firma: _____

Firma: _____

Nombre: _____

Nombre: _____

Dirección: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Teléfono: _____

Ciudad: _____

Ciudad: _____

Fecha: _____

Fecha: _____

Relación con el paciente: _____

Relación con el paciente: _____

AUTORIZACION: La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la enfermedad anteriormente mencionada. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Usted tiene el derecho a no permitir que sus muestras de sangre sean estudiadas inmediatamente o guardadas para estudios en el futuro. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del tratamiento clínico rutinario sin que éstas sean incluidas en la investigación. **Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:**

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo CONSERVAR la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en estudios futuros.

Anexo 2. Encuesta datos demográficos



UNIVERSIDAD DE
LASALLE

Anexo 2

Estudio de enfermedades transmitidas por vectores: Garrapatas, pulgas y piojos, en zonas priorizadas del departamento de Cauca. Acercamiento a la vigilancia y al control

REGISTRO INDIVIDUAL DE PACIENTE

Fecha: _____ Código: _____

Nombre: _____ Edad: _____

Número de identificación: _____ Género: M/F _____

Ocupación: _____ Teléfono: _____

EPS Subsidiado: _____ Contributivo: _____

Municipio: _____ Vereda: _____

Nombre del predio: _____

Tiempo de permanencia en la vivienda: _____ Material de construcción: Techo: _____

Servicios públicos S/N Agua: _____ Paredes: _____

Luz: _____ Piso: _____

Alcantarillado: _____

Cuántas veces por semana se baña?: _____ Cuántas veces al día se lava la manos?: _____

Número de cuartos o dormitorios en el hogar: _____ Número de habitantes en el hogar: _____

Durante el último año a presentado fiebre? S/N _____ Cuántas veces: _____ Medida con termómetro? S/N _____

Consultó al médico cuando presentó fiebre? S/N _____ Consumió antibióticos durante su episodio de fiebre? S/N _____

Cuál: _____

Quién le formuló los antibióticos: _____

Durante su episodio de fiebre, presentó alguna especie de salpido o ronchas en su cuerpo? S/N _____

En qué partes del cuerpo?: _____

Ha sido diagnosticado con Dengue, Sika, Chikungunya, Fiebre Amarilla, Malaria? S/N _____ Con cuál: _____

Durante el último año ha fumigado su casa? S/N _____ Cuántas veces: _____ Fecha última: _____

Tiene animales domésticos en su predio? S/N _____

	Cantidad	Especie	Tiempo de permanencia
Bovinos:			
Equinos:			
Caninos:			
felinos:			
Otros:			

Ha observado ratones o ratas cerca a su casa?: S/N _____ Chuchas o zariguellas?: S/N _____

PRESENCIA DE GARRAPATAS

Ha observado garrapatas en sus animales? : S/N _____ Garrapatas en su casa?: S/N _____

Hace cuánto tiempo?: _____

Tiene conocimiento si alguno de sus vecinos tiene problemas de garrapatas? : S/N _____

Ha tenido en algún momento problemas de garrapatas en su lugar de vivienda? : S/N _____

fecha de última infestación: _____ Tratamiento empleado en la erradicación: _____

Ha sido alguna vez picado por una garrapata?: S/N _____ Hace cuánto?: _____

PRESENCIA DE PULGAS

Ha observado pulgas en sus animales? : S/N _____ Pulgas en su casa?: S/N _____

Hace cuánto tiempo?: _____

Tiene conocimiento si alguno de sus vecinos tiene problemas de pulgas? : S/N _____

Ha tenido en algún momento problemas de pulgas en su lugar de vivienda? : S/N _____

fecha de última infestación: _____ Tratamiento empleado en la erradicación: _____

Ha sido alguna vez picado por una pulga?: S/N _____ Hace cuánto?: _____

PRESENCIA DE PIOJOS

Sabe si actualmente tiene piojos en su cabeza?: S/N _____ Piojos en su cuerpo?: _____

Alguna vez ha tenido piojos en su cabeza o cuerpo? S/N _____ Hace cuánto tiempo?: _____

Algún integrante de su familia actualmente tiene piojos en cabeza o cuerpo? S/N _____

Alguna vez algún integrante de su familia ha tenido piojos en cabeza o cuerpo? S/N _____

Qué tratamiento emplea para la erradicación de piojos: _____

Anexo 3. Consentimiento animales



Código N° _____

Anexo 3

Continuación - Consentimiento informado

Estudio de enfermedades transmitidas por vectores: Garrapatas, pulgas y piojos, en zonas priorizadas del departamento de Cauca. Acercamiento a la vigilancia y al control.

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA APLICACIÓN DE ESTUDIO DE CAMPO EN ANIMALES

Información sobre el Estudio

Válido desde el 1 de enero de 2017 hasta el 31 de diciembre del 2019

Yo, _____ manifiesto que he sido informado de los objetivos, metodología, beneficios y riesgos del estudio, que puedo hacer preguntas en cualquier momento y que estoy en la libertad de retirarme del estudio en cualquier momento sin causarme ninguna afectación.

Por medio de la presente autorizo a los investigadores del proyecto de la Universidad de la Salle, la Universidad Javeriana y de la secretaría de salud del Cauca, para coleccionar ectoparásitos (garrapatas y pulgas) y tomar muestras de sangre aproximadamente 10ml de los animales de mi predio sin que ellos ocasionen afectación en alguno de ellos. Los investigadores garantizan su idoneidad en el uso de técnicas adecuadas para el manejo de los animales incluidos en el estudio.

Nombre: _____

Firma: _____

Cédula de Ciudadanía No. _____

Fecha: _____

HUELLA DIGITAL INDICE DERECHO (en caso de pacientes que no sepan leer ni escribir)

	Cantidad	Especie
Canino		
Felino		
Equino		
Bovino		

AUTORIZACION: La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la enfermedad anteriormente mencionada. Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Usted tiene el derecho a no permitir que sus muestras de sangre sean estudiadas inmediatamente o guardadas para estudios en el futuro. Usted se puede retirar del estudio en cualquier momento. Los investigadores podrán guardar las muestras como parte del tratamiento clínico rutinario sin que éstas sean incluidas en la investigación. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de investigación.

Autorizo CONSERVAR la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla en estudios futuros.

Anexo 4. Protocolo Inmunofluorescencia

Procedimiento

1. Retirar las láminas antigenadas a utilizar del refrigerador, atemperar a temperatura ambiente por lo menos por 10 minutos y luego sumergirlas en PBS 1X por 10 min.
2. Retirar las placas del PBS 1X y transferirlas a la solución de bloqueo por 15 minutos.
3. Remover las placas de la solución de bloqueo y secarlas utilizando toallas para tareas delicadas tipo Kimpwipes™ de manera suave evitando rayar los pozos de las láminas, ya que esto dificulta la lectura de estas.
4. Preparar diluciones 1:64 del control positivo y de las muestras con diluyente de muestras. Usar este reactivo también como control negativo.
5. Distribuir las muestras diluidas y los controles, en los pozos indicados para cada uno en cada lámina colocando de 10µL a 20 µL (dependiendo la capacidad del pozo) sin tocar con la punta de la micropipeta la lámina.
6. Incubar las placas en cámara húmeda a 37°C por 1 hora.
7. Retirar las placas de la cámara húmeda y enjuagarlas suavemente con buffer de lavado.
8. Lavar las placas sumergiéndolas en buffer de lavado por 10 min. Repetir el lavado con buffer de lavado fresco otros 10 min.
9. Retirar las placas, escurrir y secar de acuerdo como se indica en el paso 3.
10. Preparar la dilución del conjugado (1:400 Anti-Human IgG o IgM, 1:200 del conjugado Anti-Horse IgG o IgM, 1:1600 del conjugado Anti-Dog IgG o IgM), en un criovial cubierto con aluminio y minimice la luz del recinto.
11. Distribuir en los pozos donde están los controles y las muestras.
12. Incube las placas nuevamente en una cámara húmeda a 37°C por 1 hora.
13. Repita el lavado (paso 8), usando la solución de lavado con azul de Evans.
14. Remueva las placas del buffer de lavado, séquelas con papel toalla de tareas delicadas. Agregue 2-3 gotas de solución de montaje, y coloque una lámina cubreobjetos.
15. Almacene las láminas lejos de la luz hasta la lectura en microscopio de fluorescencia.

Anexo 5. Artículo competencia vectorial

Este anexo lo puede encontrar al final del documento. Anexo 8 – Artículo 1

Anexo 6. Protocolo Síntesis de cDNA

1. Realizar tratamiento con DNase 1 (Invitrogen), para remoción de residuos de DNA. Mezclar de 1 a 7 μ l de RNA, con 1 μ l de Solución Tampon, 1 μ l de NDase y complete hasta 10 μ l con agua grado molecular
2. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos
3. Adicionar 1 μ l de ETDA
4. Incubar 65°C por 10 minutos
5. Adicionar 1 μ l de dNTPs
6. Calentar a 65°C por 5 minutos
7. Enfriar en hielo por 1 minuto
8. Adicionar 4 μ l de Solución tampón 5X, 2 μ l de DDT 0.1M, 1 μ l de RNase.
9. Incubar a 37°C por 2 minutos
10. Adicionar 1 μ l de enzima M-MLV
11. Incubar a 37° por 50 minutos
12. Realizar una segunda incubación a 70° por 15 minutos
13. Adicionar 80 μ l de agua grado molecular y almacenar a -20°C

Anexo 7. Cálculos WinEpi

Variable: Agricultor

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
		Variable de riesgo				Variable de riesgo			
		Expuestos: Agricultor	No expuestos: No agricultor	Total			Total		
Estado de salud	Enfermos	143	291	434	Estado de salud	Enfermos	134.66	299.34	434
	Sanos	14	58	72		Sanos	22.34	49.66	72
Total		157	349	506	Total		157	349	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(1.0208, 1.1689)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(1.0129, 1.1781)
3. Razón de Prevalencias :	1.0924
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Agricultor) :	91.08%
Prevalencia entre no expuestos (No agricultor) :	83.38%

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
		Variable de riesgo				Variable de riesgo			
		Expuestos: Agricultor	No expuestos: No agricultor	Total			Total		
Estado de salud	Enfermos	143	291	434	Estado de salud	Enfermos	134.66	299.34	434
	Sanos	14	58	72		Sanos	22.34	49.66	72
Total		157	349	506	Total		157	349	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(1.0984, 3.7732)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(1.1084, 3.7392)
3. Odds Ratio :	2.0358
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Agricultor) :	91.08%
Prevalencia entre no expuestos (No agricultor) :	83.38%

Variable: ama de casa

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
		Variable de riesgo				Variable de riesgo			
		Expuestos: Ama de casa	No expuestos: No ama de casa	Total			Total		
Estado de salud	Enfermos	207	227	434	Estado de salud	Enfermos	211.00	223.00	434
	Sanos	39	33	72		Sanos	35.00	37.00	72
Total		246	260	506	Total		246	260	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8974, 1.0351)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8976, 1.0348)
3. Razón de Prevalencias :	0.9638
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Ama de casa) :	84.15%
Prevalencia entre no expuestos (No ama de casa) :	87.31%

Variable: mujer

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
		Variable de riesgo				Variable de riesgo			
		Expuestos: Mujer	No expuestos: Hombre	Total			Total		
Estado de salud	Enfermos	292	142	434	Estado de salud	Enfermos	298.48	135.52	434
	Sanos	56	16	72		Sanos	49.52	22.48	72
Total		348	158	506	Total		348	158	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8708, 1.0010)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8656, 1.0070)
3. Razón de Prevalencias :	0.9336
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Mujer) :	83.91%
Prevalencia entre no expuestos (Hombre) :	89.87%

Variable: hombre

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
		Estado de salud		Total			Total		
		Enfermos	Sanos	Total			Total		
Variable de riesgo	Expuestos: Hombre	142	16	158	Variable de riesgo	Expuestos: Hombre	135.52	22.48	158
	No expuestos: Mujer	292	56	348		No expuestos: Mujer	298.48	49.52	348
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9990, 1.1484)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9930, 1.1553)
3. Razón de Prevalencias :	1.0711
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Hombre) :	89.87%
Prevalencia entre no expuestos (Mujer) :	83.91%

Variable: Tiempo de permanencia menor de 1 año

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
		Estado de salud				Estado de salud	
		Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
Variable de riesgo	Expuestos: 1 año o menos	40	7	47	40.31	6.69	47
	No expuestos: Más de 1 año	394	65	459	393.69	65.31	459
Total		434	72	506	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8748, 1.1237)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8769, 1.1210)
3. Razón de Prevalencias :	0.9915
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (1 año o menos) :	85.11%
Prevalencia entre no expuestos (Más de 1 año) :	85.84%

Variable: Tiempo de permanencia entre 1 y 5 años

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
		Estado de salud				Estado de salud	
		Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
Variable de riesgo	Expuestos: Entre 1 y 5 años	58	14	72	61.75	10.25	72
	No expuestos: Menos de 1 o más de 5	376	58	434	372.25	61.75	434
Total		434	72	506	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8252, 1.0477)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8377, 1.0321)
3. Razón de Prevalencias :	0.9298
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Entre 1 y 5 años) :	80.56%
Prevalencia entre no expuestos (Menos de 1 o más de 5) :	86.64%

Variable: Tiempo de permanencia entre 5 y 10 años

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
		Estado de salud				Estado de salud	
		Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
Variable de riesgo	Expuestos: Entre 5 y 10 años	55	9	64	54.89	9.11	64
	No expuestos: Menos de 5 o más de 10	379	63	442	379.11	62.89	442
Total		434	72	506	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9013, 1.1145)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9007, 1.1152)
3. Razón de Prevalencias :	1.0022
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Entre 5 y 10 años) :	85.94%
Prevalencia entre no expuestos (Menos de 5 o más de 10) :	85.75%

Variable: Tiempo de permanencia más de 10 años

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
		Estado de salud				Estado de salud	
		Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
Variable de riesgo	Expuestos: Más 10 años	277	42	319	273.61	45.39	319
	No expuestos: Menos de 10 años	157	30	187	160.39	26.61	187
Total		434	72	506	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9587, 1.1158)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9606, 1.1136)
3. Razón de Prevalencias :	1.0343
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Más 10 años) :	86.83%
Prevalencia entre no expuestos (Menos de 10 años) :	83.96%

Variable: Edad de 18 a 26 años (Jóvenes)

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
		Estado de salud				Estado de salud	
		Enfermos	Sanos	Total	Enfermos	Sanos	Total
Variable de riesgo	Expuestos: Jóvenes 18 a 26 años	56	11	67	57.47	9.53	67
	No expuestos: No jóvenes	378	61	439	376.53	62.47	439
Total		434	72	506	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.4652, 1.5333)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.4626, 1.5419)
3. Razón de Prevalencias :	0.8446
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Jóvenes 18 a 26 años) :	12.90%
Prevalencia entre no expuestos (No jóvenes) :	15.28%

Variable: Edad de 27 a 59 años (adultos)

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Estado de salud	Variable de riesgo	Variable de riesgo		Total	Estado de salud	Variable de riesgo		Total	
		Expuestos: Adultos	No expuestos: otro			Expuestos: Adultos	No expuestos: otro		
Enfermos	Enfermos	239	195	434	Enfermos	242.73	191.27	434	
	Sanos	44	28	72		Sanos	40.27	31.73	72
Total		283	223	506	Total		283	223	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9000, 1.0364)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8992, 1.0373)
3. Razón de Prevalencias :	0.9658
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Adultos) :	84.45%
Prevalencia entre no expuestos (otro) :	87.44%

Variable: Mayores de 60 años (persona mayor)

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Estado de salud	Variable de riesgo	Variable de riesgo		Total	Estado de salud	Variable de riesgo		Total	
		Expuestos: Mayores 60 años	No expuestos: Otro			Expuestos: Mayores 60 años	No expuestos: Otro		
Enfermos	Enfermos	136	298	434	Enfermos	131.23	302.77	434	
	Sanos	17	55	72		Sanos	21.77	50.23	72
Total		153	353	506	Total		153	353	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9800, 1.1313)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9753, 1.1367)
3. Razón de Prevalencias :	1.0529
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Mayores 60 años) :	88.89%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	84.42%

Variable: Material Paredes (Bahareque + Esterilla)

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud		Total	Variable de riesgo	Estado de salud		Total	
		Enfermos	Sanos			Enfermos	Sanos		
Expuestos: Bahareque+esterilla	Enfermos	139	25	164	Expuestos: Bahareque+esterilla	140.66	23.34	164	164
	Sanos	295	47	342		Sanos	293.34	48.66	
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9093, 1.0618)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9106, 1.0603)
3. Razón de Prevalencias :	0.9826
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Bahareque+esterilla) :	84.76%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	86.26%

Variable: Material Paredes (Bahareque)

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud		Total	Variable de riesgo	Estado de salud		Total	
		Enfermos	Sanos			Enfermos	Sanos		
Expuestos: Paredes Bahareque	Enfermos	114	17	131	Expuestos: Paredes Bahareque	112.36	18.64	131	
	Sanos	320	55	375		Sanos	321.64	53.36	375
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.6425, 2.0676)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.6423, 2.0681)
3. Odds Ratio :	1.1526
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Bahareque) :	87.02%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.33%

Variable: Material Paredes (Esterilla)

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud		Total	Variable de riesgo	Estado de salud		Total	
		Enfermos	Sanos			Enfermos	Sanos		
Expuestos: Esterilla	Enfermos	25	8	33	Expuestos: Esterilla	28.30	4.70	33	
	Sanos	409	64	473		Sanos	405.70	67.30	473
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites no válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.7200, 1.0661)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.7523, 1.0203)
3. Razón de Prevalencias :	0.8761
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Esterilla) :	75.76%
Prevalencia entre no expuestos (otro material) :	86.47%

Variable: Material Paredes (Cemento)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
	Expuestos: Cemento	18	2	20		Expuestos: Cemento	17.15	2.85	20
	No expuestos: otro material	416	70	486		No expuestos: otro material	416.85	69.15	486
	Total	434	72	506		Total	434	72	506

1. Límites :	Límites no válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9045, 1.2223)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8799, 1.2565)
3. Razón de Prevalencias :	1.0514
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Cemento) :	90.00%
Prevalencia entre no expuestos (otro material) :	85.60%

Variable: Material Paredes (Ladrillo)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
	Expuestos: Ladrillo	277	45	322		Expuestos: Ladrillo	276.18	45.82	322
	No expuestos: otro material	157	27	184		No expuestos: otro material	157.82	26.18	184
	Total	434	72	506		Total	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9359, 1.0860)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9363, 1.0856)
3. Razón de Prevalencias :	1.0082
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Ladrillo) :	86.02%
Prevalencia entre no expuestos (otro material) :	85.33%

Variable: Material Paredes (Ladrillo + cemento)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
	Expuestos: Ladrillo + cemento	295	47	342		Expuestos: Ladrillo + cemento	293.34	48.66	342
	No expuestos: Otro material	139	25	164		No expuestos: Otro material	140.66	23.34	164
	Total	434	72	506		Total	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9418, 1.0997)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9431, 1.0982)
3. Razón de Prevalencias :	1.0177
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Ladrillo + cemento) :	86.26%
Prevalencia entre no expuestos (Otro material) :	84.76%

Variable: Material Piso (Tierra)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
	Expuestos: Tierra	65	17	82		Expuestos: Tierra	70.33	11.67	82
	No expuestos: otro material	369	55	424		No expuestos: otro material	363.67	60.33	424
	Total	434	72	506		Total	434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8106, 1.0235)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8246, 1.0061)
3. Razón de Prevalencias :	0.9108
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Tierra) :	79.27%
Prevalencia entre no expuestos (otro material) :	87.03%

Variable: Material Piso (Madera)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
	Expuestos: Piso Madera	10	0	10		Expuestos: Piso Madera	8.58	1.42	10
	No expuestos: Otro	424	72	496		No expuestos: Otro	425.42	70.58	496
	Total	434	72	506		Total	434	72	506

1. Límites :	Límites no válidos
2. Significación :	Resultado significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(1.1281, 1.2130)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9234, 1.4820)
3. Razón de Prevalencias :	1.1698
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Piso Madera) :	100.00%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.48%

Variable: Material Piso (Cemento)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Piso cemento	275	45	320	Variable de riesgo	Expuestos: Piso cemento	274.47	45.53	320
	No expuestos: Otro	159	27	186		No expuestos: Otro	159.53	26.47	186
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9336, 1.0825)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9339, 1.0822)
3. Razón de Prevalencias :	1.0053
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Piso cemento) :	85.94%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.48%

Variable: Material Piso (Cerámica)

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Piso cerámica	84	10	94	Variable de riesgo	Expuestos: Piso cerámica	80.62	13.38	94
	No expuestos: Otro	350	62	412		No expuestos: Otro	353.38	58.62	412
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9703, 1.1404)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9615, 1.1509)
3. Razón de Prevalencias :	1.0519
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Piso cerámica) :	89.36%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	84.95%

Variable: Presencia de fiebre último año

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Fiebre SI	139	24	163	Variable de riesgo	Expuestos: Fiebre SI	139.81	23.19	163
	No expuestos: Fiebre NO	295	48	343		No expuestos: Fiebre NO	294.19	48.81	343
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9183, 1.0706)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9188, 1.0700)
3. Razón de Prevalencias :	0.9915
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Fiebre SI) :	85.28%
Prevalencia entre no expuestos (Fiebre NO) :	86.01%

Variable: Animales en predio

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Animales en predio SI	394	60	454	Variable de riesgo	Expuestos: Animales en predio SI	389.40	64.60	454
	No expuestos: NO Animales en predio	40	12	52		No expuestos: NO Animales en predio	44.60	7.40	52
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9680, 1.3149)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9979, 1.2755)
3. Razón de Prevalencias :	1.1282
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Animales en predio SI) :	86.78%
Prevalencia entre no expuestos (NO Animales en predio) :	76.92%

Variable: Ratas cerca de casa

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: SI ratas cerca a la casa	272	53	325	Variable de riesgo	Expuestos: SI ratas cerca a la casa	278.75	46.25	325
	No expuestos: NO ratas cerca a la casa	162	19	181		No expuestos: NO ratas cerca a la casa	155.25	25.75	181
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8725, 1.0021)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8689, 1.0063)
3. Razón de Prevalencias :	0.9351
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (SI ratas cerca a la casa) :	83.69%
Prevalencia entre no expuestos (NO ratas cerca a la casa) :	89.50%

Variable: Chuchas cerca de casa

Nivel de confianza % : 95%									
Frecuencias Observadas					Frecuencias Esperadas				
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: SI chucha cerca a la casa	110	22	132	Variable de riesgo	Expuestos: SI chucha cerca a la casa	113.22	18.78	132
	No expuestos: NO chucha cerca a la casa	324	50	374		No expuestos: NO chucha cerca a la casa	320.78	53.22	374
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8826, 1.0484)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8865, 1.0438)
3. Razón de Prevalencias :	0.9619
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (SI chucha cerca a la casa) :	83.33%
Prevalencia entre no expuestos (NO chucha cerca a la casa) :	86.63%

Variable: Garrapatas en los animales al momento de la visita

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Garrapatas en animales	223	37	260	Variable de riesgo	Expuestos: Garrapatas en animales	223.00	37.00	260
	No expuestos: Otro	211	35	246		No expuestos: Otro	211.00	35.00	246
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9314, 1.0735)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9314, 1.0736)
3. Razón de Prevalencias :	1.0000
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Garrapatas en animales) :	85.77%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.77%

Variable: Garrapatas en predio al momento de la visita

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Garrapatas en predio	55	8	63	Variable de riesgo	Expuestos: Garrapatas en predio	54.04	8.96	63
	No expuestos: Otro	379	64	443		No expuestos: Otro	379.96	63.04	443
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9218, 1.1296)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9171, 1.1354)
3. Razón de Prevalencias :	1.0204
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Garrapatas en predio) :	87.30%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.55%

Variable: Problemas de garrapatas en algún momento en el predio

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Problemas de garrapatas	64	5	69	Variable de riesgo	Expuestos: Problemas de garrapatas	59.18	9.82	69
	No expuestos: Otro	370	67	437		No expuestos: Otro	374.82	62.18	437
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(1.0142, 1.1833)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9911, 1.2109)
3. Razón de Prevalencias :	1.0955
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Problemas de garrapatas) :	92.75%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	84.67%

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8994, 5.9730)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9208, 5.8343)
3. Odds Ratio :	2.3178
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Problemas de garrapatas) :	92.75%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	84.67%

Variable: Picadura previa de garrapata

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Mordedura garrapata	111	17	128	Variable de riesgo	Expuestos: Mordedura garrapata	109.79	18.21	128
	No expuestos: Otro	323	55	378		No expuestos: Otro	324.21	53.79	378
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9373, 1.0989)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9355, 1.1009)
3. Razón de Prevalencias :	1.0149
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Mordedura garrapata) :	86.72%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.45%

Variable: Presencia de perros en la vivienda

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Perros en predio	334	55	389	Variable de riesgo	Expuestos: Perros en predio	333.65	55.35	389
	No expuestos: otro	100	17	117		No expuestos: otro	100.35	16.65	117
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9228, 1.0936)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9233, 1.0930)
3. Razón de Prevalencias :	1.0046
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Perros en predio) :	85.86%
Prevalencia entre no expuestos (otro) :	85.47%

Variable: Presencia de caballos en la vivienda

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Caballos en predio	69	10	79	Variable de riesgo	Expuestos: Caballos en predio	67.76	11.24	79
	No expuestos: Otro	365	62	427		No expuestos: Otro	366.24	60.76	427
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9314, 1.1209)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9272, 1.1260)
3. Razón de Prevalencias :	1.0218
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Caballos en predio) :	87.34%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	85.48%

Variable: Presencia de vacas en la vivienda

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Vacas en predio	49	4	53	Variable de riesgo	Expuestos: Vacas en predio	45.46	7.54	53
	No expuestos: Otro	385	68	453		No expuestos: Otro	388.54	64.46	453
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9981, 1.1856)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9723, 1.2170)
3. Razón de Prevalencias :	1.0878
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Vacas en predio) :	92.45%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	84.99%

Agrupación Piso tierra + madera

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Piso tierra+madera	75	17	92	Variable de riesgo	Expuestos: Piso tierra+madera	78.91	13.09	92
	No expuestos: Otro	359	55	414		No expuestos: Otro	355.09	58.91	414
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8470, 1.0435)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8558, 1.0327)
3. Razón de Prevalencias :	0.9401
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Piso tierra+madera) :	81.52%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	86.71%

Agrupación piso cerámica + cemento

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas					
Variable de riesgo		Estado de salud		Total	Variable de riesgo		Estado de salud		Total
		Enfermos	Sanos				Enfermos	Sanos	
Variable de riesgo	Expuestos: Piso cemento+cerámica	359	55	414	Variable de riesgo	Expuestos: Piso cemento+cerámica	355.09	58.91	414
	No expuestos: Otro	75	17	92		No expuestos: Otro	78.91	13.09	92
Total		434	72	506	Total		434	72	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9583, 1.1807)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9683, 1.1685)
3. Razón de Prevalencias :	1.0637
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Piso cemento+cerámica) :	86.71%
Prevalencia entre no expuestos (Otro) :	81.52%

Agrupación presencia de ratas y chuchas en el predio

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud		Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud	
		Enfermos	Sanos			Enfermos	Sanos
Expuestos: Ratas y chuchas	Enfermos	91	17	92.63	15.37	108	108
	Sanos	343	55	341.37	56.63	398	398
Total		434	72	434	72	506	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.8931, 1.0703)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.8960, 1.0669)
3. Razón de Prevalencias :	0.9777
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Ratas y chuchas) :	84.26%
Prevalencia entre no expuestos (otro) :	86.18%

Agrupación personas que mencionaron tener garrapatas al momento de la visita y previamente

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud		Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud	
		Enfermos	Sanos			Enfermos	Sanos
Expuestos: Garrapatas en predio	Enfermos	30	3	28.30	4.70	33	33
	Sanos	404	69	405.70	67.30	473	473
Total		434	72	434	72	506	506

1. Límites :	Límites no válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9495, 1.1930)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9253, 1.2243)
3. Razón de Prevalencias :	1.0644
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Garrapatas en predio) :	90.91%
Prevalencia entre no expuestos (Nunca garrapatas en predio) :	85.41%

Agrupación perros y caballos

Nivel de confianza % : 95%

Frecuencias Observadas				Frecuencias Esperadas			
Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud		Variable de riesgo	Estado de salud	Estado de salud	
		Enfermos	Sanos			Enfermos	Sanos
Expuestos: Perros y caballos	Enfermos	62	8	60.04	9.96	70	70
	Sanos	372	64	373.96	62.04	436	436
Total		434	72	434	72	506	506

1. Límites :	Límites válidos
2. Significación :	Resultado no significativo
Aproximación logarítmica : IC 95%:	(0.9462, 1.1390)
Aproximación Chi ² : IC 95%:	(0.9379, 1.1490)
3. Razón de Prevalencias :	1.0381
4. Resultados adicionales :	
Prevalencia entre expuestos (Perros y caballos) :	88.57%
Prevalencia entre no expuestos (otro) :	85.32%

Comparación valores test exacto de Fisher y Prueba de Chi²

VARIABLE	Test exacto de fisher			Prueba de Chi ²	
	Valor P	Odds ratio	IC 95%	Odds ratio	IC 95%
Agricultor	0,0271	2,036	1,112 – 3,688	2,0358	1,1084 – 3,7392
Ama de casa	0,3123	0,7716	0,4661 – 2,257	0,7716	0,4680 – 1,2722

Mujer	0,0987	0,5875	0,3295 – 1,037	0,5875	0,3269 – 1,0559
Hombre	0,0987	1,0702	0,9639 – 3,035	1,7021	0,9471 – 3,0588
Tiempo de permanencia menor de 1 año	0,8285	0,9427	0,4144 – 2,294	0,9427	0,4047 – 2,1958
Tiempo de permanencia entre 1 y 5 años	0,2007	0,6391	0,3400 – 1,199	0,6391	0,3362 – 1,2147
Tiempo de permanencia entre 5 y 10 años	>0,9999	1,016	4,4868 – 2,156	1,0158	0,4778 – 2,1597
Tiempo de permanencia más de 10 años	0,4291	1,260	0,7717 – 2,066	1,2602	0,7586 – 2,0936
Edad de 18 a 26 años (Jóvenes)	0,5748	0,8215	0,4038 – 1,660	0,8215	0,4078 – 1,6552
Edad de 27 a 59 años (adultos)	0,3712	0,7800	0,4722 – 1,278	0,7800	0,4684 – 1,2986
Mayores de 60 años (persona mayor)	0,2135	1,477	0,8182 – 2,612	1,4765	0,8280 – 2,6329
Material Paredes (Bahareque – Esterilla)	0,6840	0,8858	0,5293 – 1,529	0,8858	0,5236 – 1,4985
Material Paredes (Bahareque)	0,7715	1,153	0,6562 – 2,033	1,1526	0,6423 – 2,0681
Material Paredes (Esterilla)	0,1165	0,4890	0,2207 – 1,065	0,4890	0,2145 – 1,1149
Material Paredes (Cemento)	0,7532	1,514	0,3735 – 6,719	1,5144	0,3468 – 6,6129
Material Paredes (Ladrillo)	0,8949	1,059	0,6313 – 1,748	1,0586	0,6318 – 1,7738
Variable: Material Paredes (Ladrillo+cemento)	0,6840	1,129	0,6541 – 1,889	1,1289	0,6673 – 1,9097
Material Piso (Tierra)	0,0828	0,5699	0,3101 – 1,027	0,5699	0,3130 – 1,0375
Material Piso (Madera)	0,3707	Infinito	0,4953 – infinito	17,1707*	0,2358 – 1250,1767
Material Piso (Cemento)	0,8956	1,038	0,6119 – 1,713	1,0377	0,6194 – 1,7386
Material Piso (Cerámica)	0,3274	1,488	0,7357 – 3,030	1,4880	0,7345 – 3,0145
Presencia de fiebre último año	0,8918	0,9424	0,5600 – 1,575	0,9424	0,5545 – 1,6016
Animales en predio	0,0607	1,970	1,009 – 3,898	1,9760	0,9882 – 3,9274
Ratas cerca de casa	0,0844	0,6019	0,3472 – 1,051	0,6019	0,3454 – 1,0489
Chuchas cerca de casa	0,3848	0,7716	0,468 – 1,346	0,7716	0,4471 – 1,3315
Garrapatas en los animales al momento de la visita	>0,9999	0,9997	0,6091 – 1,632	0,9997	0,6067 – 1,6475
Garrapatas en predio al momento de la visita	0,8479	1,161	0,5316 – 2,459	1,1609	0,5281 – 2,5521

Problemas de garrapatas en algún momento en el predio	0,0936	2,318	0,9224 – 5,519	2,3178	0,9208 – 5,8343
Picadura previa de garrapatas	0,7718	1,112	0,6320 – 1,960	1,1118	0,6191 – 1,9966
Presencia de perros en la vivienda	0,8812	1,032	0,5864 – 1,828	1,0324	0,5731 – 1,8597
Presencia de caballos en la vivienda	0,7295	1,172	0,5699 – 2,382	1,1721	0,5729 – 2,3980
Presencia de vacas en la vivienda	0,2097	2,164	0,7983 – 5,764	2,1636	0,7733 – 6,0538
Agrupación piso tierra + madera	0,1913	0,6759	0,3732 – 1,205	0,6759	0,3725 – 1,2265
Agrupación piso cemento y cerámica	0,1913	1,480	0,8301 – 2,679	1,4795	0,8153 – 2,6848
Agrupación presencia de ratas y chuchas o zarigüeyas en el predio	0,6417	0,8583	0,4817 – 1,511	0,8583	0,4753 – 1,5502
Agrupación haber tenido problemas de garrapatas en predio, al momento de la visita o previamente	0,6044	1,708	0,5441 – 5,453	1,7079	0,5135 – 5,6802
Agrupación presencia de perros y caballos en predio	0,5816	1,333	0,6183 – 2,818	1,3333	0,6105 – 2,9119



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tbdis

Experimental infection and vector competence of *Amblyomma patinoi*, a member of the *Amblyomma cajennense* species complex, for the human pathogen *Rickettsia rickettsii*

Heidy-C Martínez-Díaz^a, Elkin Forero-Becerra^b, Marylin Hidalgo^a, Marcelo B. Labruna^{c,*}

^a Grupo de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

^b Estancia postdoctoral – Convocatoria Colciencias 704/2017, Laboratorio de Bacteriología Especial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C., Colombia

^c Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo-USP, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Vector competence
Experimental infection
Rickettsia rickettsii
Amblyomma patinoi

ABSTRACT

Amblyomma patinoi ticks infected with *Rickettsia rickettsii* are present in Colombia, but its vector competence is unknown. Hence, we evaluated the vector competence of *A. patinoi* with *R. rickettsii* under laboratory conditions. Experimental guinea pigs and rabbits (males and females) were separated in the infected group (IG) and the control group (CG). In the IG, the filial 1 (F1) larvae (*R. rickettsii*-free) from Colombian *A. patinoi* engorged female specimens were exposed to *R. rickettsii* (ITU strain) by feeding on infected guinea pigs. Next, F1 nymphs and adults, and F2 larvae were allowed to feed on uninfected guinea pigs or rabbits and tested by qPCR targeting the *gBA* rickettsial gene. All animals used to feed the IG F1 ticks became febrile and had *R. rickettsii* infection (89% fatality rate) detected through serological or molecular techniques. After the F1 larvae ticks became *R. rickettsii* infected, subsequent IG tick stages were able to maintain the rickettsial infection by transstadial maintenance to all infested animals, indicating *A. patinoi* vector competence. Subsequently, almost 31% of the F1 female egg masses and only 42% of their F2 larvae were infected. Less than 50% of the infected females transmitted *R. rickettsii* transovarially, and only a part of the offspring were infected. This study demonstrated that *A. patinoi* might not be able to sustain *R. rickettsii* infection by transovarial transmission for successive tick generations without horizontal transmission via rickettsiemic hosts. This condition might result in low *R. rickettsii*-infection rates of *A. patinoi* under natural conditions.

1. Introduction

The bacterium *Rickettsia rickettsii* is the causative agent of Rocky Mountain spotted fever, a life-threatening illness also known as Brazilian spotted fever in Brazil (Labruna, 2009) or Tobia spotted fever in Colombia (Patino et al., 1937). This pathogen is restricted to the Americas, where it has been reported in Argentina, Brazil, Canada, Colombia, Costa Rica, the United States, Mexico, and Panama (Dumler and Walker, 2005; Labruna et al., 2011). In many of these countries, the detection of rickettsial agents was carried out during the first half of the 20th century. After a long period of epidemiological silence, rickettsial

infections have re-emerged as a public health problem in the last decade of the 20th century and the beginning of the 21st century (Dumler and Walker, 2005).

In Colombia, several studies have been carried out aiming to understand tick-borne diseases, including rickettsioses, since the 1930s (Patino et al., 1937). In the 21st century, several outbreaks of human rickettsiosis by *R. rickettsii* occurred in different regions of the country: Villeta (Cundinamarca) in 2004; Necoclí (Antioquia) in 2006; Los Córdoba (Córdoba) in 2007; and Turbo (Antioquia) in 2008 (Acosta et al., 2006; Hidalgo et al., 2011, 2007a; Pacheco et al., 2008).

Currently, different tick species have been involved as vectors of

Abbreviations: RH, relative humidity; *gBA*, rickettsial citrate synthase gene; IG, infected group; CG, control group; F1, first laboratory generation; F2, second laboratory generation; CEI, Conversion Efficiency Index; TOT, Transovarial Transmission Rate; FIR, Filial Infection Rate; dpi, days post-infestation; IFA, Indirect Immunofluorescence Assay; SP, São Paulo (Brazil).

* Corresponding author.

E-mail address: labruna@usp.br (M.B. Labruna).

<https://doi.org/10.1016/j.tbdis.2021.101751>

Received 10 January 2021; Received in revised form 27 March 2021; Accepted 4 May 2021
Available online 29 May 2021

1877-959X/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Molecular detection of tick-borne rickettsial pathogens in ticks collected from domestic animals from Cauca, Colombia

Heidy-Carolina Martínez Díaz^a, Juliana Gil-Mora^a, Paola Betancourt-Ruiz^a, Carlos Ramiro Silva-Ramos^a, J. Manuel Matiz-González^a, María-Alejandra Villalba-Pérez^a, María Catalina Ospina-Pinto^b, Alejandro Ramírez-Hernández^{c,d}, Luz-Adriana Olaya-M^e, Eliana Bolaños^f, Claudia Cuervo^a, Efraín Benavides^b, Marilyn Hidalgo^{a,*}

^a Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 40 – 62 D.C., Bogotá, Colombia

^b Grupo Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

^c Grupo Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

^d Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

^e Universidad Libre, Seccional Cali, Cali, Colombia

^f Secretaría Departamental de Salud, Cauca, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Molecular identification
Ticks
Rickettsia
Anaplasma
Ehrlichia
Colombia

ABSTRACT

Some hard ticks' species can act as vectors of a wide variety of pathogens of human and animal importance such as *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* spp. In Colombia, a total of forty-six tick species have been described, and some of them have been implicated as vectors of some infectious agents. The department of Cauca is one of the thirty-two departments of Colombia. Most of its population lives in rural areas and depends on agriculture as the main economic activity, favoring exposure to ticks and tick-borne pathogens. Thus, the present study aimed to determine the tick species and tick-borne pathogens circulating in this region. From August to November 2017, ticks were collected from dogs, horses and cattle from eight rural areas of four municipalities in the department of Cauca. All collected ticks were classified according to taxonomic keys and organized in pools. DNA was extracted from all tick pools for molecular confirmation of tick species and detection of *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* spp. A total of 2809 ticks were collected which were grouped in 602 pools. Ticks were morphologically identified as *Amblyomma cajennense sensu lato*, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. The molecular identity of *A. cajennense* s.l. was confirmed as *Amblyomma patinoi*. A total of 95% of the pools scored positive for members of the Anaplasmataceae family, of which, 7.8% and 7.3% were positive to *Anaplasma* and *Ehrlichia* spp., respectively, being identified as *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia minutus* and *Ehrlichia canis*; and 16.1% were positive for *Rickettsia* spp. with high identity for *Rickettsia asemboensis*, *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia senegalensis*. This is the first report describing the natural infection of ticks with rickettsial pathogens and the occurrence of *A. patinoi* ticks in Cauca department, Colombia.

1. Introduction

Hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) are blood-feeding ectoparasites of wild and domestic vertebrates (Guglielmone et al., 2014). They are widely distributed throughout the world and some species act as vectors of a wide variety of pathogenic microorganisms for humans and different animal species (Parola et al., 2013; Madison-Antenucci et al., 2020).

Some of these microorganisms are members of the Order Rickettsiales, which are vector-borne bacteria mainly transmitted by different hard tick species. This order includes two families: Anaplasmataceae and Rickettsiaceae; both comprise different bacterial genera that include several pathogenic species of human and animal importance such as *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Rickettsia* and *Orientia* spp. (Dumler et al., 2001; Lu et al., 2019).

Anaplasma, *Ehrlichia* (Anaplasmataceae family) and *Rickettsia* spp.

* Corresponding author.

E-mail address: hidalgo.m@javeriana.edu.co (M. Hidalgo).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106773>

Received 10 August 2022; Received in revised form 26 October 2022; Accepted 19 November 2022

Available online 20 November 2022

0001-706X/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Seroprevalence and Genotypic Analysis of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs and Humans in Cauca, Colombia

Elkin Forero-Becerra,^{1*} Jignesh Patel,² Heidy-C Martínez-Díaz,³ Paola Betancourt-Ruiz,³ Efraín Benavides,⁴ Steven Durán,⁴ Luz-A Olaya-Másmela,⁵ Eliana Bolaños,⁶ Marilyn Hidalgo,³ and Jere W. McBride²

¹Research Training Program, Fogarty International Center (Code 1 D43), University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas; ²Department of Pathology, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas; ³Grupo de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia; ⁴Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia; ⁵Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de La Salud, Universidad Libre – Cali, Sede Valle del Lili, Santiago de Cali, Colombia; ⁶Secretaría de Salud del Departamento del Cauca, Popayán, Colombia

Abstract. *Ehrlichia canis* infections have been reported in humans in Venezuela and Costa Rica. In this study, 506 healthy residents and 114 dogs from four municipalities (Cauca, Colombia) were surveyed and blood samples collected. Antibodies to *E. canis* in human and canine sera were evaluated using the Tandem repeat protein 19 (TRP19) peptide ELISA and indirect immunofluorescence assay (IFA). *Ehrlichia canis* TRP19 antibodies were detected in only 1/506 human sera, but the single positive sample was negative by IFA. The majority (75/114; 66%) of dogs surveyed had antibodies to the *E. canis* TRP19 peptide by ELISA, and eight randomly selected sera were further confirmed by *E. canis* IFA. Genomic DNA samples obtained from 73 *E. canis* TRP19 ELISA-positive dog blood samples were examined by PCR targeting the 16S ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene. *Ehrlichia canis* 16S rRNA was amplified in 30 (41%) of the dogs, and 16 amplicons were selected for DNA sequencing, which confirmed that all were *E. canis*. A second PCR was performed on the 16 confirmed *E. canis* 16S rRNA PCR-positive samples to determine the TRP36 genotype by amplifying the *tp36* gene. TRP36 PCR amplicon sequencing identified nine dogs infected with the U.S. *E. canis* TRP36 genotype (56%), one dog with the Brazilian genotype (6%), and six dogs with the Costa Rican genotype (38%). Moreover, these molecular genotype signatures were consistent with serologic analysis using TRP36 genotype-specific peptides. Notably, there was no serologic evidence of *E. canis* infection in humans, suggesting that *E. canis* infection in dogs in Cauca is not associated with zoonotic human infection.

INTRODUCTION

Human infections with *Ehrlichia* species are increasingly being diagnosed in several countries, where factors such as the presence and number of reservoir animals and tick vectors in endemic areas could play a critical role in emerging infections.¹ The genus *Ehrlichia* has six recognized species that infect humans or animals: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium*, *Ehrlichia muris*, and *Ehrlichia mhasensis*.^{2,3} *Ehrlichia chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*, and *E. muris* subsp. *ecuatarensis* have been identified as causative agents of zoonotic emerging human infections, where the first three agents are also known to cause ehrlichiosis in dogs.^{4,5} *Ehrlichia canis* has been associated with human infections in Venezuela and Costa Rica by serological and molecular tests.^{6–8}

Tandem repeat proteins (TRPs) in *E. chaffeensis* and *E. canis* are major immunoreactive proteins with species-specific linear epitopes in the tandem repeat domain.⁹ In particular, *E. canis* TRP19 and TRP140 are species-specific antigens with exposed, conserved surface domains,^{10–12} whereas the *E. canis* TRP36, is a species-specific antigen with different TR sequences among *E. canis* strains.¹³ Previous studies have demonstrated that TRP19 and TRP36 are excellent immunodiagnostic antigens.^{10,14,15} Tandem repeat protein 36 has been used in many studies to define genotypic differences among *E. canis* strains by sequencing the tandem repeat region which exhibits variability in the nucleic acid sequence and in the number of

tandem repeats.^{5,16–18} Recently, differences in TRP36 epitope containing tandem repeats has been used to perform serogenotypic analysis and has revealed evidence of sequential or coinfections in dogs with multiple *E. canis* strains.^{14,19}

In Colombia, several reports have established and documented the seroprevalence and/or molecular evidence of *E. canis* infection in dogs throughout the country.^{16–22} In addition, there are reports of human ehrlichiosis where cytoplasmic inclusions consistent with ehrlichial morulae have been visualized in peripheral blood smears of humans or *Ehrlichia*-reactive antibodies have been detected by indirect immunofluorescence assay (IFA).^{23,24}

Using dogs as sentinels for human rickettsial diseases has been suggested as an approach for disease surveillance by One Health.²⁵ In this study, we investigated the seroprevalence of *E. canis* infection in humans and dogs in municipalities of Cauca, Colombia, to investigate the prevalence of *E. canis* infection in dogs, characterize *E. canis* genotypes, and investigate the possible occurrence of zoonotic infections in humans who own infected dogs.

MATERIALS AND METHODS

Study population and sample collection. A cross-sectional study was carried out in the Department of Cauca (Colombia, South America). Samples were collected between August and November of 2017 in four municipalities (see Supplemental Table S1). Those municipalities were selected according to previous reports of human tick infestations or tick bites, ecological conditions for development of tick populations, security warrant for the field collection personnel, and ease of access to the rural human populations. To establish an appropriate sample size for the human population,

*Address correspondence to Elkin Forero-Becerra, Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Av. Central del Norte No. 39-115, Tunja 150001, Colombia. E-mail: eforerob@unsl.edu.co

RESEARCH LETTERS

Emerging Tickborne Bacteria in Cattle from Colombia

Alejandro Ramírez-Hernández, Esteban Arroyave, Álvaro A. Faccini-Martínez, Heidy C. Martínez-Díaz, Paola Betancourt-Ruiz, Luz-Adriana Olaya-M, Elkin G. Forero-Becerra, Marylin Hidalgo, Lucas S. Blanton, David H. Walker

Author affiliations: Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia (A. Ramírez-Hernández); University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA (A. Ramírez-Hernández, E. Arroyave, A.A. Faccini-Martínez, L.S. Blanton, D.H. Walker); Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá (A.A. Faccini-Martínez); Servicios y Asesorías en Infectología Sai S.A.S., Bogotá (A.A. Faccini-Martínez); Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá (H.C. Martínez-Díaz, P. Betancourt-Ruiz, E.G. Forero-Becerra, M. Hidalgo); Universidad Libre, Cali, Colombia (L.-A. Olaya-M)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2810.220657>

Ehrlichia minasensis is a new pathogenic bacterial species that infects cattle, and *Borrelia theileri* causes bovine borreliosis. We detected *E. minasensis* and *B. theileri* DNA in cattle from southwestern Colombia by using PCR. *E. minasensis* and *B. theileri* should be considered potential etiologies of febrile syndrome in cattle from Colombia.

Ehrlichia spp. are tickborne obligate intracellular bacteria and comprise different pathogenic species that affect both veterinary and public health (1). *Ehrlichia minasensis* was first detected in cattle and deer in Canada and later in cattle and *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil (2–4). Infected cattle manifest signs that include fever, lethargy, depression, and anorexia (3,4). *Borrelia theileri* belongs to the relapsing fever group of borreliae and causes bovine borreliosis, which is a mild febrile disease associated with lethargy, hemoglobinuria, and anemia (5). This spirochete is transmitted by *Rhipicephalus* (formerly *Boophilus*) sp. ticks and has been documented in Africa, Europe, Oceania, and South America (5,6). To our knowledge, *E. minasensis* or *B. theileri* infections have not been reported in cattle from Colombia.

During September and October 2017, we collected blood samples from 30 bovines with tick parasitism in El Tambo and Santander de Quilichao municipalities, Cauca department, Colombia (Appendix Figure, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/28/10/22-0657-App1.pdf>). We extracted DNA from blood using the QIAGEN DNeasy Blood

& Tissue Kit (<https://www.qiagen.com>), according to the manufacturer's instructions. We verified DNA quality using PCR amplification of the vertebrate cytochrome B gene *CYTB*. We subsequently performed PCR to detect *dsb* and *trp36* genes for *Ehrlichia* spp.; *flaB* and 16S rRNA genes for *Borrelia* spp.; and *rpoB*, *msp4*, and *msp1a* genes for *Anaplasma* spp. (Appendix Table). DNA samples that produced strong PCR bands underwent sequencing on an Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, <https://www.thermofisher.com>). The *msp1a* PCR products were poor quality and did not undergo sequencing. We aligned sequences using GeneStudio (GeneStudio, Inc., <https://genestudio-pro.software.informer.com>) and performed multiple sequence alignments using the EMBL-European Bioinformatics Institute tools MUSCLE (for *Ehrlichia* spp.) and ClustalW (for *Borrelia* and *Anaplasma* spp.) (<https://www.clustal.org>). Phylogenetic analyses were performed with MEGA X software (<https://www.megasoftware.net>). We generated phylogenetic trees for *dsb*, *flaB*, and 16S rRNA genes and Trp36 protein using the maximum-likelihood estimation method. All procedures were approved by the Pontificia Universidad Javeriana Ethics Committee in Colombia.

We detected *CYTB* in all samples. We detected the *dsb* gene in 10% (3/30) and *trp36* in 20% (6/30) of samples. The *flaB* gene was detected in 13.3% (4/30), and the 16S rRNA gene was detected in 10% (3/30) of samples. The *rpoB* gene was amplified in 90% (27/30), *msp4* was amplified in 83.3% (25/30), and *msp1a* was amplified in 83.3% (25/30) of samples. We performed phylogenetic analyses of 3 sequences for *dsb* (GenBank accession nos. ON209405–7), 6 sequences for Trp36 protein (inferred from GenBank accession nos. OL513405–10), 3 sequences for the 16S rRNA gene (GenBank accession nos. ON112216–8), 4 sequences for *flaB* (GenBank accession nos. ON135431–4); 6 sequences for *rpoB* (GenBank accession nos. ON209412–7), and 4 sequences for *msp4* (GenBank accession nos. ON209408–11).

Phylogenetic analyses showed that our *dsb* gene sequences clustered with *E. minasensis dsb* sequences from Brazil, Australia, and Colombia (Figure, panel A). The greater genetic diversity of Trp36 protein compared with *dsb* provided more detailed characterization of *Ehrlichia* sp. genotypes. Our Trp36 sequences clustered with 3 sequences from Brazil and a recently described *E. minasensis* strain from China isolated from *Haemaphysalis hystricis* ticks (Figure, panel B). The *flaB* and 16S rRNA genes clustered with *B. theileri* sequences (Figure, panels C, D).

Arbovirus Antibody Seroprevalence in the Human Population from Cauca, Colombia

Juliana Gil-Mora ¹, L Yoana Acevedo-Gutiérrez ², Paola L Betancourt-Ruiz ¹,
Heidy C Martínez-Díaz ¹, Diana Fernández ², Nathen E Bopp ², Luz A Olaya-Másmela ³,
Eliana Bolaños ⁴, Efraín Benavides ⁵, Alejandro Villasante-Tezanos ⁶, Marilyn Hidalgo ¹,
Patricia V Aguilar ^{2 7}

Affiliations

PMID: 36375460 DOI: 10.4269/ajtmh.22-0120

Abstract

Several arboviruses have emerged or reemerged into the New World during the past several decades, causing outbreaks of significant proportion. In particular, the outbreaks of Dengue virus (DENV), Zika virus, and Chikungunya virus (CHIKV) have been explosive and unpredictable, and have led to significant adverse health effects. These viruses are considered the leading cause of acute undifferentiated febrile illnesses in Colombia. However, Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) is endemic in Colombia, and arboviruses such as the Mayaro virus (MAYV) and the Oropouche virus (OROV) cause febrile illnesses in neighboring countries. Yet, evidence of human exposure to MAYV and OROV in Colombia is scarce. In this study, we conducted a serosurvey study in healthy individuals from the Cauca Department in Colombia. We assessed the seroprevalence of antibodies against multiple arboviruses, including DENV serotype 2, CHIKV, VEEV, MAYV, and OROV. Based on serological analyses, we found that the overall seroprevalence for DENV serotype 2 was 30%, 1% for MAYV, 2.6% for CHIKV, 4.4% for VEEV, and 2% for OROV. This study provides evidence about the circulation of MAYV and OROV in Colombia, and suggests that they-along with VEEV and CHIKV-might be responsible for cases of acute undifferentiated febrile illnesses that remain undiagnosed in the region. The study results also highlight the need to strengthen surveillance programs to identify outbreaks caused by these and other vector-borne pathogens.

LinkOut - more resources

Full Text Sources

Sheridan PubFactory

Miscellaneous

NCI CPTAC Assay Portal

RESEARCH ARTICLE

Amblyomma mixtum free-living stages: Inferences on dry and wet seasons use, preference, and niche width in an agroecosystem (Yopal, Casanare, Colombia)

Elkin Forero-Becerra^{1*}, Alberto Acosta², Efraín Benavides³, Heldy-C. Martínez-Díaz⁴, Marilyn Hidalgo⁴

1 Faculty of Sciences, Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, **2** Faculty of Sciences, Department of Biology, UNESIS (Unidad de Ecología y Sistemática), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, **3** Facultad de Ciencias Agropecuarias, Grupo de Investigación Epidemiología y Salud Pública, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia, **4** Faculty of Sciences, Laboratorio de Bacteriología Especial, Department of Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

* eglorerob@una.edu.co



OPEN ACCESS

Citation: Forero-Becerra E, Acosta A, Benavides E, Martínez-Díaz H-C, Hidalgo M (2022) *Amblyomma mixtum* free-living stages: Inferences on dry and wet seasons use, preference, and niche width in an agroecosystem (Yopal, Casanare, Colombia). PLoS ONE 17(4): e0245109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245109>

Editor: Shawky M Abouelhadid, Beni Suef University Faculty of Veterinary Medicine, EGYPT

Received: December 21, 2020

Accepted: March 2, 2022

Published: April 6, 2022

Copyright: © 2022 Forero-Becerra et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information files](#).

Funding: M.H. received the Grant code 00007171 by the Convocatoria 06 of 2016 for Interdisciplinary Research Projects of the Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá Campus. E.F.-B. was financed through the postdoctoral fellowship of Colciencias (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia), Convocatoria 784 of 2017. Also,

Abstract

The formulation of effective control strategies for any pest species generally involves the study of habitat use and preference and niche width in anthropogenically transformed natural landscapes. We evaluated whether the use, habitat preference, and niche range of the *Amblyomma mixtum* tick changed between stages, habitats, and seasonality (dry-wet seasons 2019) on a farm in Yopal (Casanare, Colombia). The presence and relative abundance of free-living larvae, nymphs, and adults was quantified in four different habitats according to the type of vegetation cover (Riparian Forest, Cocoa Crop, King Grass Crop, and Star Grass Paddock). Habitat availability was estimated, environmental variables were analyzed, and various indices of habitat use and preference, and niche width were calculated. *A. mixtum*'s habitat use and preference, and niche width changed between stages, habitat types, and time of the year. The total abundance of *A. mixtum* was an order of magnitude greater in the dry season than the wet season. In the dry season, all stages used all habitats, while *A. mixtum* adults used all the habitats in both seasons. In the dry season, nymphs and larvae preferred three out of the four habitats, while adults preferred the King Grass Crop. In the wet season, nymphs and larvae preferred two habitats, whereas the adults preferred the King Grass Crop. The value of the niche width index was high for larvae, nymphs, and adults in the dry season, while it was high only for adults in the wet season. Thus, *A. mixtum*'s vast environmental tolerance and niche breadth allows the species to use and colonize changing habitats (unstable or temporary) with fluctuating environmental conditions (e.g., King Grass Crop), potentially keeping a stable population over time and making it an extremely resistant species. However, the wet flooding season in Yopal may exceed *A. mixtum*'s stages' tolerances.

Volume 29, Number 2—February 2023

Research Letter

Serologic Evidence of *Orientia* Infection among Rural Population, Cauca Department, Colombia

Álvaro A. Faccini-Martínez, Carlos Ramiro Silva-Ramos, Lucas S. Blanton, Esteban Arroyave, Heidy-C. Martínez-Díaz, Paola Betancourt-Ruiz, Marylin Hidalgo, and David H. Walker

Author affiliations: Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia (Á.A. Faccini-Martínez); Servicios y Asesorías en Infectología, Bogotá (Á.A. Faccini-Martínez); Hospital Militar Central, Bogotá (Á.A. Faccini-Martínez); University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA (Á.A. Faccini-Martínez, L.S. Blanton, E. Arroyave, D.H. Walker); Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá (C.R. Silva-Ramos, H.-C. Martínez-Díaz, P. Betancourt-Ruiz, M. Hidalgo)

[Cite This Article](#)

Abstract

We assessed serum samples collected in Cauca Department, Colombia, from 486 persons for *Orientia* seroreactivity. Overall, 13.8% showed reactive IgG by indirect immunofluorescence antibody assay and ELISA. Of those samples, 30% (20/67) were confirmed to be positive by Western blot, showing ≥ 1 reactive band to *Orientia* 56-kD or 47-kD antigens.

Scrub typhus, caused by species in the genus *Orientia*, is a reemerging mite-borne rickettsiosis and a major cause of acute undifferentiated febrile illness (AUF) (1). Classically, scrub typhus was believed to be strictly endemic to the so-called tsutsugamushi triangle, which ranges from southeastern Siberia in the North to the Kamchatka Peninsula in the East, northern Australia in the South, and Pakistan in the West (2). However, scrub typhus outside the tsutsugamushi triangle was suggested 70 years ago because seropositivity to *O. tsutsugamushi* was found among persons from several countries in Africa (3).

On This Page

[Research Letter](#)[Cite This Article](#)

Figures

[Figure](#)

Tables

[Table](#)

Downloads

[Article](#)[Appendix](#)