

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

**ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN DE AGENTES RICKETTSALES TRANSMITIDOS POR
PULGAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

PAOLA LEONOR BETANCOURT RUIZ

TUTORA

MARYLIN HIDALGO, M.Sc, PH.D.

BOGOTÁ. D.C., COLOMBIA

MAYO DE 2019

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN DE AGENTES RICKETTSIALES TRANSMITIDOS POR
PULGAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

PAOLA LEONOR BETANCOURT RUIZ

TRABAJO DE GRADO

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUTORA

MARYLIN HIDALGO, M.Sc, Ph.D.

BOGOTÁ. D.C., COLOMBIA

MAYO DE 2019

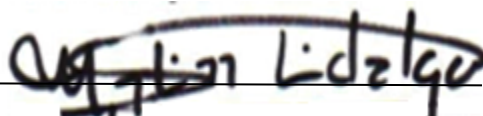
**ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN DE AGENTES RICKETTSIALES TRANSMITIDOS POR
PULGAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

PAOLA LEONOR BETANCOURT RUIZ

APROBADO



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá



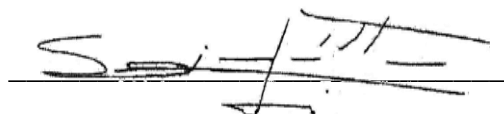
MARYLIN HIDALGO M.Sc, Ph.D

Tutora



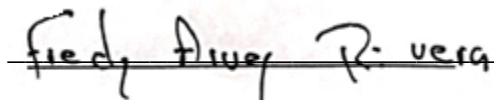
KARLA DZUL ROSADO Ph.D

Jurado



SALIM MATTAR Ph.D.

Jurado



FREDY ARVEY RIVERA Ph.D.

Jurado

**ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN DE AGENTES RICKETTSIALES TRANSMITIDOS POR
PULGAS EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**



PAOLA LEONOR BETANCOURT RUIZ





CONCEPCIÓN PUERTA, Ph.D.

Decana

Facultad de Ciencias





ALBA ALICIA TRESPALACIOS, Ph.D.

Directora 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”

DEDICATORIA

¡Al ángel de ojos azules más hermoso del cielo, a ti Papá!

A mi mamá, hermanos, sobrinos y esposo, por su infinito amor, confianza,
paciencia y apoyo. durante este proceso.

A Marylin Hidalgo, por su confianza, guía, cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien hace posible todas las cosas.

A mi mamá, por creer siempre en mí, por su confianza y amor infinito.

A mis hermanos: Oscar, Edwin, Santi y Tepha por su apoyo incondicional, por su gran amor, por motivarme siempre y hacerme sonreír aun cuando creo que es difícil el camino.

A mis sobrinos: Gaby y Emi, por ser mi más grande motivación, por todo el amor y apoyo que me brindan.

A Luis, por acompañarme en cada paso, por su infinito amor y tomarme de la mano para construir juntos nuestros sueños.

A mis cuñadas: Marce, Angie y Mary, por sus palabras de aliento y fortaleza.

A mi tutora, la doctora Marylin Hidalgo, por su confianza en mí para desarrollar este proyecto, por su apoyo durante estos años, su cariño y sus consejos.

A Colciencias por el financiamiento del 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”, con número 12037445209, contrato 731-2016.

A la Pontificia Universidad Javeriana por ser mi Alma Máter, por brindar los espacios necesarios para mi desarrollo académico.

Al equipo de la Secretaria de Salud departamental del Cauca y la Universidad de la Salle, por su apoyo y acompañamiento en el desarrollo del proyecto.

A los habitantes de las veredas: La Sierra, El Zarzál, El Placer, Betania, Lomitas Arriba, Lomitas Abajo y Resguardo Huellas en el departamento del Cauca, por su participación y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A Claudia Cuervo, Alba Alicia Tres Palacios y Hugo Diez, por su apoyo y buenos deseos.

A Juliana Gil, Heidy Martínez y Ángela Muñoz, por su ayuda, apoyo y compañía incondicional.

A los integrantes del Laboratorio de Bacteriología Especial por su compañía y apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	14
LISTA DE ANEXOS	15
RESUMEN	16
1.1.1 <i>Palabras clave:</i>	17
ABSTRACT	18
1.1.2 <i>Key words:</i>	19
2 JUSTIFICACIÓN	20
3 MARCO TEÓRICO	22
3.1 Generalidades de <i>Rickettsia</i>	22
3.1.1 <i>Historia</i>	22
3.1.2 <i>Características microbiológicas, taxonómicas y filogenéticas de Rickettsia</i>	25
3.1.3 <i>Patogénesis y fisiopatología de las Rickettsias</i>	28
3.1.4 <i>Relación vector-artrópodo y Rickettsias</i>	31
3.2 Rickettsiosis transmitidas por pulgas.....	33
3.2.1 <i>Generalidades de las pulgas</i>	33
3.2.2 <i>Tifo murino</i>	38
3.2.3 <i>Fiebre manchada transmitida por pulgas</i>	42

4	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo general.....	47
4.2	Objetivos específicos.....	47
5	METODOLOGÍA	48
5.1	Área geográfica de estudio.....	48
5.2	Determinación de seroprevalencia en humanos contra <i>Rickettsia</i> transmitida por pulgas.50	
5.3	Detección molecular de especies de <i>Rickettsias</i> en ADN extraído de sangre y pulgas de animales domésticos.....	51
5.3.1	<i>Recolección de las muestras de sangre de animales domésticos.....</i>	<i>51</i>
5.3.2	<i>Extracción de ADN de muestras de sangre.....</i>	<i>51</i>
5.3.3	<i>Evaluación del ADN extraído de Sangre.....</i>	<i>51</i>
5.3.4	<i>Recolección de las muestras de pulgas de animales domésticos y roedores.....</i>	<i>52</i>
5.3.5	<i>Clasificación taxonómica de pulgas capturadas sobre animales domésticos.....</i>	<i>53</i>
5.3.6	<i>Extracción de ADN de pulgas.....</i>	<i>53</i>
5.3.7	<i>Evaluación del ADN extraído de pulga.....</i>	<i>54</i>
5.3.8	<i>Detección molecular de especies de Rickettsias en ADN extraído de sangre y pulgas de animales domésticos.....</i>	<i>54</i>
5.3.9	<i>Digestión con endonucleasas.....</i>	<i>57</i>
5.3.10	<i>Secuenciación de productos amplificados.....</i>	<i>58</i>
6	RESULTADOS	59

6.1	Muestras de suero	59
6.2	Detección de <i>Rickettsia</i> sp. en muestras de sangre de perros y gatos.....	60
6.2.1	<i>Recolección de las muestras de sangre de animales doméstico.....</i>	<i>60</i>
6.2.2	<i>Evaluación del ADN extraído de sangre.....</i>	<i>61</i>
6.2.3	<i>Detección molecular de especies de Rickettsias en ADN extraído de sangre.....</i>	<i>61</i>
6.3	Detección de especies de <i>Rickettsia</i> en pulgas recolectadas sobre animales.....	62
6.3.1	<i>Evaluación del ADN extraído de pulga.....</i>	<i>62</i>
6.3.2	<i>Detección de Rickettsias pooled de pulgas recolectadas sobre perros y gatos.....</i>	<i>64</i>
6.3.2.1	<i>Tamizaje-Detección de gen gltA por PCR en tiempo real.....</i>	<i>64</i>
6.4	Identificación de especies de <i>Rickettsia</i> por digestión de productos amplificados con endonucleasas.	67
6.4.1	<i>Digestión de productos amplificados para el gen 17KDa con enzima XbaI.....</i>	<i>67</i>
6.4.2	<i>Digestión de productos amplificados para el gen ompB con enzima NlaIV.....</i>	<i>68</i>
6.5	Secuenciación de productos amplificados.	68
7	DISCUSIÓN	72
8	CONCLUSIONES	78
9	RECOMENDACIONES	79
10	BIBLIOGRAFÍA.....	80
11	ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia rickettsial y potencial patogénico.	26
Figura 2. Clasificación taxonómica bacterias género <i>Rickettsia</i>	28
Figura 3. Entrada de <i>Rickettsia</i> a la célula diana.	31
Figura 4. Larva de <i>Ctenocephalides felis</i>	35
Figura 5. A) Estadio pupa <i>Ctenocephalides felis</i> . B) Pupa de <i>Ctenocephalides felis</i> recubierta por sustratos y detritos	35
Figura 6. Morfología general de una pulga adulta (Hembra).	37
Figura 7. Algoritmo de diagnóstico para enfermedades Rickettsiales	41
Figura 8. Distribución Política del departamento del Cauca	49
Figura 9. Distribución de muestras de sangre según animal y vereda de procedencia.	60
Figura 10. Productos amplificados para el gen β -actina en muestras de sangre	61
Figura 11. Distribución de pooles de pulgas, por vereda y especie de animal.	63
Figura 12. Productos amplificados para el gen β -actina en pooles de pulgas	63
Figura 13. Diagrama pooles de pulgas positivos en tamizaje para <i>gltA</i> en tiempo real.	64
Figura 14. Productos amplificados para el gen 17KDa en pooles de pulgas	65
Figura 15. Distribución de resultados obtenidos para la amplificación del 17KDa en pooles de pulga por vereda.	65
Figura 16. Productos amplificados para el gen <i>ompB</i> en muestras de sangre.	66

Figura 17. Distribución de resultados obtenidos para la amplificación del gen <i>ompB</i> en pooles de pulga por vereda.....	66
Figura 18. Patrones de restricción con <i>XbaI</i> para el gen <i>17-kD</i>	67
Figura 19. Patrones de restricción con <i>NlaIV</i> para el gen <i>ompB</i>	68
Figura 20. Árbol filogenético gen <i>gltA</i>	70
Figura 21. Árbol filogenético gen <i>ompB</i>	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores y protocolo de PCR para el gen β -actina	52
Tabla 2. Iniciadores y condiciones de PCR para el gen <i>gltA</i> de <i>Rickettsias</i>	55
Tabla 3. Iniciadores y condiciones de PCR para el gen <i>17kD</i>	56
Tabla 4. Iniciadores y condiciones de PCR para el gen <i>ompB</i>	56
Tabla 5. Perfiles de restricción para especies de <i>Rickettsia</i>	58
Tabla 6. Tamaños de muestra y seroprevalencia contra <i>R. typhi</i> y <i>R. felis</i> por vereda...	59
Tabla 7. Resultados de alineamiento secuencias obtenidas para confirmación <i>R. felis</i> , <i>R. asemonensis</i> y <i>Ca. "Rickettsia senegalensis"</i>	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado	91
Anexo 2. Encuesta datos sociodemográficos	94
Anexo 3. Número de acceso GenBank “P127”: MK548197.1.....	95
Anexo 4. Número de acceso GenBank “P127”: MK548198.1.....	96
Anexo 5. Producción Científica #1	97

RESUMEN

Rickettsia typhi y *Rickettsia felis* son patógenos transmitidos por pulgas, ambos se caracterizan por producir enfermedad febril aguda indiferenciada. En la última década, se han reportado nuevas especies, denominadas organismos similares a *R. felis* o “*Rickettsia felis-like organisms*” (RFLO) en distintos artrópodos, entre estas: *R. asemonensis* y *Candidatus R. senegalensis*. En Colombia, específicamente en el departamento de Caldas se ha informado la presencia de *R. felis* en pulgas y en garrapatas de Villeta, Cundinamarca, sin embargo, no se han realizado estudios en otras áreas de Colombia por lo que nos planteamos como objetivo determinar la seroprevalencia de rickettsiosis transmitidas por pulgas en humanos e identificar especies de *Rickettsia* sp. en pulgas recolectadas sobre perros y gatos del departamento del Cauca.

Se realizó un estudio de corte transversal para la recolección de muestras de humanos entre julio y noviembre de 2017, para detectar anticuerpos IgG contra *R. felis* y *R. typhi* por IFI. Adicionalmente se recolectaron pulgas de perros y gatos, fueron clasificadas taxonómicamente y organizadas en pools, la identificación de genes rickettsiales se realizó por qPCR para el gen *gltA*, y por PCR convencional para *ompB* y *17KDa*. A las muestras con al menos dos genes positivos, se les realizó la técnica PCR-RFLP para los productos de *17KDa* se usó la enzima *XbaI* y para *ompB* se utilizó la enzima *NlaIV*. Los resultados fueron confirmados por secuenciación. Se colectaron 506 muestras de humanos, en las que se determinó una seroprevalencia de 60,5% (306/506) contra *R. typhi* y de 40% (22/80) contra *R. felis*. Se recolectaron 1284

pulgas, todas identificadas como *Ctenocephalides felis*; se organizaron en 245 pooles de los que el 58% (144/245) fueron positivos para *gltA*, y de estos el 96,5% (139/144) para *ompB* y 17KDa; la restricción se realizó a todos los productos positivos para el gen 17KDa, identificando el 100% de las muestras como *R. felis*-RFLO y para el gen *ompB*, identificando el 14,4% como *R. felis*, el 84,9% *R. asemonensis* y el 0,7% *Candidatus R. senegalensis*. Una muestra identificada para cada especie, fue confirmada por secuenciación. Este estudio muestra la seroprevalencia contra *R. typhi* y *R. felis* en el departamento del Cauca siendo evidencia de co-circulación de estas dos especies; estos resultados coinciden con los reportados para otras zonas de Colombia, sin embargo, son altos comparados con los obtenidos en otras regiones del mundo, 2% para *R. typhi* en Grecia, 10,3% para el grupo de tifo en el Amazonas peruano, 3,8–18% y 3,2–6,5% contra *R. typhi* y *R. felis* en España. Adicionalmente es el primer reporte de *Candidatus Rickettsia senegalensis* en pulgas *C. felis* recolectadas de perros en Colombia, obteniendo 99,8% de identidad con las secuencias de *gltA* y *ompB* reportadas en el Genbank. Esta especie había sido reportada en África, Asia, India, Estados Unidos y Chile y su capacidad zoonótica aún no está descrita. Se determinó la seroprevalencia de rickettsiosis transmitidas por pulgas, en el departamento del Cauca y la alta circulación especies de *R. felis* o RFLO en las zonas priorizadas del departamento.

1.1.1 Palabras clave:

Rickettsia asemonensis, *Rickettsia* spp, *Candidatus Rickettsia senegalensis*, *Ctenocephalides felis*, Colombia

ABSTRACT

Rickettsia typhi and *Rickettsia felis* are pathogens transmitted by fleas, both are characterized for generating undifferentiated acute febrile illness. In the last decade, new species have been reported in different arthropods designated as "*Rickettsia felis-like organisms*" (RFLO), among them: *R. asemonensis* and *Candidatus R. senegalensis*. In Colombia, specifically in the department of Caldas, the presence of *R. felis* in fleas and in ticks from Villeta, Cundinamarca has been reported, however no studies have been conducted in other areas of Colombia. To determine the seroprevalence of rickettsiosis transmitted by fleas in humans and identify species of *Rickettsia* sp. in fleas collected from dogs and cats from the department of Cauca.

A cross-sectional study was conducted for the collection of human samples between July and November of 2017 to detect IgG antibodies against *R. felis* and *R. typhi* by IFI. Additionally, fleas were collected from dogs and cats, taxonomically classified and organized into pools, rickettsial gene identification was performed by qPCR for the *gltA* gene, and by conventional PCR for *ompB* and *17KDa*. Samples with at least two positive genes were analyzed by PCR-RFLP, for the *ompB* products the *NlaIV* enzyme was used. The results were confirmed by sequencing. 506 human samples were collected, in which a seroprevalence of 60,5% was detected against *R. typhi* and 40% against *R. felis*. 1284 fleas were collected, all identified as *Ctenocephalides felis*; they were organized in 245 pools from which 58% (144/245) were positive for *gltA*, and from them 96,5% (139/144) for *ompB* and *17KDa*; the restriction was made to all the positive products for the *ompB* gene, identifying 14,4% as *R. felis*, 84,9% as *R. asemonensis*

and 0,7% *Candidatus R. senegalensis*. A sample identified for each species was confirmed by sequencing. This study shows the seroprevalence against *R. typhi* and *R. felis* in the department of Cauca, this serves as evidence of co-circulation of these two species; additionally these results coincide with others studies from different areas of Colombia , however they are higher compared to those obtained in other regions of the world, 2% for *R. typhi* in Greece, 10,3% for the typhus group in the Peruvian Amazon, 3,8-18% and 3,2-6,5% against *R. typhi* and *R. felis* in Spain. Furthermore, this is the first report of *Candidatus Rickettsia senegalensis* in *C. felis* fleas collected from dogs in Colombia, obtaining 99,8% identity with the *gltA* and *ompB* sequences reported in Genbank. This species had been reported in Africa, Asia, India, the United States and Chile and its zoonotic capacity is not yet described. The seroprevalence of rickettsiosis transmitted by fleas was determined in the department of Cauca and the high circulation species of *R. felis* or RFLO in the prioritized areas of the department.

1.1.2 Key words:

Rickettsia asembonensis, *Rickettsia* spp, *Candidatus Rickettsia senegalensis*, *Ctenocephalides felis*, Colombia

2 JUSTIFICACIÓN

Las rickettsiosis son enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes, causadas por bacterias del género *Rickettsia*, que pueden ser transmitidas al humano a través de la picadura o el contacto con heces de diferentes artrópodos, entre los que se encuentran garrapatas, piojos, ácaros y pulgas (Merhej, Angelakis et al. 2014). Las especies de *Rickettsia* transmitidas por pulgas son: *R. typhi*, *R. felis* y recientemente descritas: *R. asembonensis* y *Candidatus Rickettsia senegalensis*; aunque la patogenicidad no está claramente descrita para todas las especies, se conoce que *R. typhi* y *R. felis* son los agentes causales de algunos síndromes febriles.

R. typhi es el agente causal del tifo murino o endémico, que se caracteriza por un estado febril con un período de incubación de aproximadamente 14 días asociado con dolor de cabeza y eritema cutáneo (Bitam, Dittmar et al. 2010); y *R. felis* es el agente causal de la fiebre manchada transmitida por pulgas, la infección se caracteriza por desencadenar en los pacientes un síndrome febril similar al tifo murino. Se conoce que estas bacterias son transmitidas por las pulgas *Xenopsylla cheopis* y *Ctenocephalides felis* (Capelli, Montarsi et al. 2009, Hidalgo, Montoya et al. 2013). Los porcentajes de seroprevalencia reportados en diferentes países del mundo, evidencian la circulación de agentes rickettsiales transmitidos por pulgas, así como la identificación de genes rickettsiales en pulgas colectadas sobre perros y gatos (Billeter, Diniz et al. 2016, Khan, Bora et al. 2016).

En Colombia se conoce que el departamento de Caldas es endémico para tifo murino y que en algunos estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha detectado la presencia de *R. felis* y *R. asembonensis* en pulgas *C. felis*, en ese departamento (Hidalgo, Montoya et al. 2013). Así mismo, se ha identificado la presencia de *R. felis* en pulgas *C. felis* colectadas sobre perros en el municipio de Villeta, Cundinamarca (Faccini-Martínez, Ramírez-Hernández et al. 2016).

En el departamento del Cauca, el único estudio realizado sobre rickettsiosis, determinó la circulación de agentes del grupo de las fiebres manchadas en dos

municipios del departamento, sin embargo, no existen estudios sobre rickettsiosis transmitidas por pulgas, por lo que es importante determinar si la población de este departamento ha estado en contacto con estas especies bacterianas. Adicionalmente, teniendo en cuenta que los perros, gatos y roedores son los principales hospederos de las pulgas para realizar su ciclo de vida, del cual dependerá el ciclo de vida de las rickettsias, la búsqueda y genotipificación de especies de *Rickettsia* spp. en pulgas colectadas sobre mamíferos domésticos, permitirá conocer la circulación de estos microorganismos. Este trabajo aportará al conocimiento de las enfermedades rickettsiales y sus resultados apoyarán la construcción de medidas de prevención y vigilancia epidemiológica de rickettsiosis en este departamento.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de *Rickettsia*

Las bacterias del género *Rickettsia* son bacilos cortos (0,3 -0,5 x 0,8 a 2,0 μm^2), aerobios, intracelulares obligados, poseen una estructura trilaminar característica de bacterias Gram negativas, conformada por una bicapa lipídica y una capa de peptidoglicano; la tinción del Gram, no tiñe este género bacteriano, sin embargo, pueden observarse con la tinción de Gimenez, donde se las bacterias, se observan rojas brillantes por la fucsina básica y en contraste con el azul pálido del verde malaquita (Philippe 2007)

3.1.1 Historia

El término “*Rickettsia*” fue descrito por primera vez por da Rocha-Lima, un microbiólogo brasilero, quien da nombre al agente etiológico del tifo epidémico “*Rickettsia prowazeki*” en honor a Howard Taylor Ricketts y Stanislav von Prowazek, pioneros en las investigaciones sobre el tifo (Emilio 1988).

En 1904, en el primer volumen de “The Journal of Infectious Diseases”, Wilson y Chowning, publicaron sus investigaciones sobre la alta incidencia de una grave enfermedad infecciosa, con alta letalidad en el oeste de Montana, conocida en dicha localidad como fiebre manchada (Wilson and Chowning 1979, Walker 2004); en 1906 el médico H.T: Ricketts se enfocó en dilucidar el problema de la Fiebre Manchada de las montañas Rocosas, se encargó de describir la transmisión experimental de infección y la capacidad de una garrapata hembra para adquirir la infección de un

cobayo infectado y transmitirla a un cobayo sano a través de su picadura (Walker 2004); en su intento por cumplir los postulados de Koch, cultivó en medios tradicionales sangre de pacientes y animales infectados para aislar e identificar el agente infeccioso sin embargo, contrario a lo que esperaba en la época, no fue posible hacerlo, aunque logró evidenciar algunos diplobacilos microscópicamente en muestras de sangre. Sus estudios fueron publicados entre 1906 y 1907, en su interés por estudiar un brote de tifo murino en México y su gran similitud con la fiebre manchada, muere a causa de esta enfermedad.

Años más tarde, en 1909 Charles Nicolle demostró que el tifo epidémico, (una enfermedad similar a la fiebre de las montañas rocosas), era transmitido por piojos; observó que gran parte de la población padecía la enfermedad, y que el número de pacientes iba aumentando conforme pasaban los días, y una vez las salas de espera se encontraban llenas, los pacientes que esperaban a las afueras del hospital la seguían transmitiendo, que incluso su ropa parecía esparcir la enfermedad; ya que una vez los pacientes recibían un baño, y cambiaron su vestimenta dejaron de ser infecciosos. Una vez planteó la hipótesis del piojo como vector de la enfermedad, inyectó un chimpancé con sangre de un paciente infectado y después de varios días colectó piojos que transfirió a un chimpancé sano, este último desarrolló un síndrome febril diez días después. Su descubrimiento en la forma de transmisión del tifo epidémico le otorgó en 1928 el premio Nobel de medicina (Gross 1996).

En 1917 Neill reportó que los cobayos infectados con sangre de pacientes con tifo murino, desarrollaban una sintomatología similar a la fiebre manchada de las

montañas rocosas causada por *R. rickettsii*, resultado confirmado por Mooser durante el estudio de tifo mexicano, quien reportó que los dos tipos de infección se podrían distinguir por las reacciones causadas en los cobayos (Wolbach 1919, Mooser 1928). En 1919 Wolbach describió por primera vez el agente etiológico de la fiebre manchada de las montañas rocosas como un organismo intracelular encontrado en células endoteliales y que el núcleo estaba lleno con partículas diminutas y usualmente distendido (Wolbach 1919)

En 1923 Cowdry definió *Rickettsia* como “organismos similares a bacterias intracelulares y Gram-negativas”, con el fin de realizar un estudio de la distribución de estos microorganismos en distintos artrópodos, esta definición fue dada ya que para la literatura de la época existían diversos criterios para diferenciar estos microorganismos de otras bacterias ya conocidas. Sus resultados enfatizaron características generales, como la diversidad y especificidad de hospederos, la adaptación como organismos intracelulares y la existencia de transmisión transovárica a la progenie (Cowdry 1923).

Posteriores estudios en microscopía electrónica, biología molecular, cultivo celular y secuenciación, han permitido continuar con el trabajo realizado por los pioneros de esta disciplina, planteando nuevos problemas en la clasificación, filogenia y epidemiología de las enfermedades causadas por organismos rickettsiales (Gillespie, Williams et al. 2008).

3.1.2 Características microbiológicas, taxonómicas y filogenéticas de Rickettsia.

Las bacterias del género *Rickettsia*, pertenecen al Reino: Bacteria, Filum: Proteobacteria, clase: α -proteobacteria, Orden: Rickettsiales, Familia: Rickettsiaceae, se caracterizan por ser coco-bacilos Gram negativos, aerobios e intracelulares obligados, con un tamaño de genoma aproximado de 1.1 Mb y con bajo contenido de GC (29-33%), se divide por fisión binaria en el citoplasma de células eucariotas (Yu and Walker 2006) y su ciclo de vida incluye vertebrados e invertebrados que pueden actuar como vectores o reservorios primarios (Olano 2005). Los pequeños mamíferos actúan como reservorios o amplificadores y los humanos en la mayoría de los casos son hospederos accidentales. El género *Rickettsia* contiene 27 especies oficialmente validadas, los principales vectores de estas bacterias son las garrapatas, aunque también se encuentra asociada a piojos, pulgas o ácaros (Figura 1) (Merhej, Angelakis et al. 2014).

Para el 2007 las especies del género *Rickettsia* se encontraban clasificadas en tres grupos teniendo en cuenta sus características morfológicas, antigénicas y metabólicas: i) Grupo de las Fiebres manchadas (GFM): conformado por las especies transmitidas por garrapatas (*R. rickettsii* y *R. conorii* entre otras), por pulgas (*R. felis*) y ácaros (*R. akari*), con una temperatura de crecimiento óptima de 32°C, movimiento intracelular tanto en el citoplasmas como en el núcleo por polimerización de actina y reacción cruzada serológica con antígenos somáticos de cepas de *Proteus* OX2 y OX19 (únicamente para *R. rickettsii*), con un contenido GC 32-33% y causantes de fiebres manchadas en humanos (Badiaga, Benkouiten et al. 2012); ii) Grupo del Tifo

(GT): conformado por *R. typhi* transmitida por pulgas y *R. prowazekii* transmitida por el *Pediculus humanus corporis*, con un óptimo crecimiento a 35°C, polimerización parcial (*R. typhi*) o ausencia (*R. prowazekii*) de actina, reacción cruzada serológica con antígenos somáticos de cepas de *Proteus* OX19, con un contenido GC 29% y causantes de Tifo en humanos; iii) Grupo del tifo de los matorrales, con una única especie (*R. tsutsugamushi*), que fue reclasificada en el 2014 al género *Orientia*, también perteneciente a la familia Rickettsiaceae (Parola 2007).

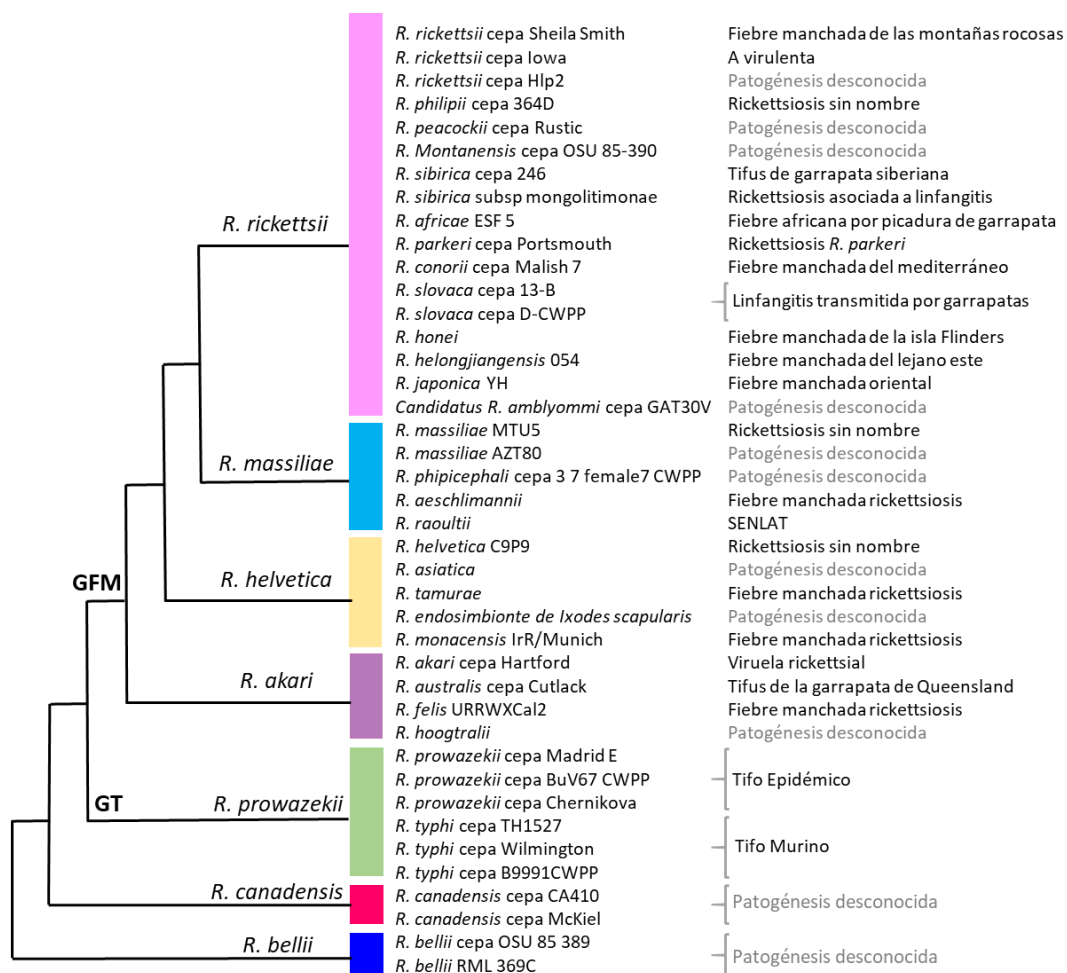


Figura 1. Filogenia rickettsial y potencial patogénico. Cladograma esquemático de todas las especies de *Rickettsia* reconocidas, obtenido en base a las secuencias de las proteínas de membrana externa y la citrato sintasa (Modificado de: Merhej, Angelakis et al. 2014)

Sin embargo, gracias a las herramientas moleculares y el desarrollo de métodos de genotipificación, se logró una clasificación más exacta de las especies pertenecientes al género *Rickettsia*, teniendo en cuenta porcentajes de similitud superiores al 98,1% y 86,5% para los genes *rrs* (16S rDNA) y *gltA* (Citrato sintasa) respectivamente (Fuxelius, Darby et al. 2007), con especies previamente validadas, estas características permiten clasificar un microorganismo dentro de este género, y la amplificación y secuenciación de genes más específicos y variables, que codifican proteínas de membrana externa y antígenos de superficie (*ompA*, *ompB*, *sca4*, entre otros), permitieron la caracterización a nivel de especie. Esta última clasificación, organizó las especies pertenecientes al género *Rickettsia* en cuatro grupos: i) Grupo de las Fiebres manchadas al cual pertenecen: *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. rickettsii*, entre otras que son transmitidas por garrapatas. ii) Grupo transicional constituido por *R. felis* y *R. akari*, transmitidas por pulgas y ácaros, comparten características genotípicas y fenotípicas intermedias de los grupos tradicionales. iii) Grupo del Tifo al cual pertenecen las especies *R. typhi* y *R. prowazekii*, transmitidas por pulgas y piojos, respectivamente. iv) Grupo ancestral, constituido por las primeras especies divergentes en el género, *R. bellii* y *R. canadensis*, relacionadas con garrapatas sin patogenicidad conocida (Figura 2) (Fuxelius, Darby et al. 2007).

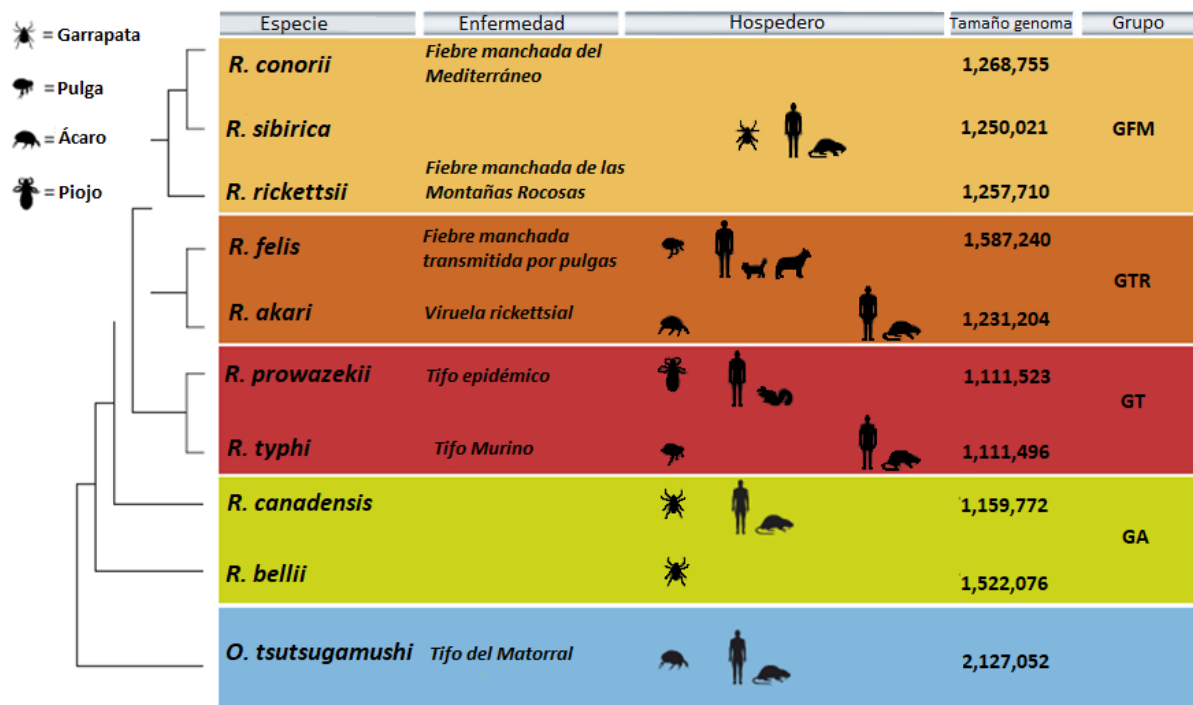


Figura 2. Clasificación taxonómica bacterias genero Rickettsia Modificado de: Fuxelius, Darby et al. 2007

3.1.3 Patogénesis y fisiopatología de las Rickettsias

Las bacterias del género *Rickettsia* se caracterizan por ser transmitidas por diferentes artrópodos (garrapatas, piojos, pulgas y ácaros) a través del proceso de hematofagia o en eliminación por heces (de acuerdo con la especie) la mayoría de sus especies son patógenas para el hombre, quien actúa como un hospedero accidental, excepto *R. prowazekii* en donde el hombre es esencial para el mantenimiento del ciclo de vida de esta especie (Yu and Walker 2006).

La inoculación de la bacteria se da a través de la saliva durante la picadura de garrapatas (especies GFM) o ácaros (*R. akari*), o por la inoculación de heces contaminadas de pulgas o piojos (*R. typhi*, *R. felis* o *R. prowazekii*), cuando estas

últimas entran en contacto con mucosas, conjuntivas o abrasiones de la piel (*Yu and Walker 2006*).

Su característica de bacterias intracelulares obligadas, es un concepto que implica varios pasos para llevar a cabo la infección de sus células blanco: 1) transmisión, 2) entrada al hospedero (3) propagación a otros órganos, (4) contacto con la célula diana (adherencia e invasión), (5) supervivencia dentro del huésped (evasión de las defensas del huésped y adaptación al entorno), y (6) extensión del nicho (modulación de la biología del huésped, multiplicación y supervivencia) (*Olano 2005*). Dentro del huésped las células endoteliales son el blanco principal de infección para todas las especies patógenas, excepto *R. akari* que tiene tropismo por macrófagos, sin embargo, se pueden afectar células perivasculares, hepatocitos y monocitos (*Uchiyama 2012*)

El modelo que ha sido descrito para caracterizar la entrada de las bacterias a las células, es *R. conorii*, en donde se demostró que la proteína Ku70 (una proteína presente en el núcleo, citoplasma y microdominios de la membrana plasmática de las células eucariotas), sirve como receptor de las proteínas de membrana externa ompB codificadas por los genes *sca1*, *sca2*, *sca4* (presente en todas las especies de *Rickettsia*). El gen *sca1* codifica para una adhesina que permite que *R. conorii*, se adhiera a las células epiteliales y endoteliales de los mamíferos pero no representa ningún papel importante en la invasión (*Riley, Goh et al. 2010*); el gen *sca2* se encuentra y se expresa en *R. conorii* y se conserva entre muchas especies del GFM, y participa en las interacciones mediadoras con células diana de mamíferos (*Cardwell and Martinez 2009*); en *R. parkeri* este gen desempeña un papel como mediador

similar a la formina (proteína de unión a actina) de la motilidad basada en actina, lo que indica que algunas de las proteínas bacterianas Sca pueden interactuar con las proteínas del huésped para promover la supervivencia de las bacterias al interior de las células (Haglund, Choe et al. 2010). La unión Ku70-ompB, es suficiente para mediar la internalización de la bacteria en las células endoteliales como “fagocitosis inducida” lo que permite la invasión rickettsial, una vez las bacterias se encuentran en el interior de la célula, escapan del fagosoma al citoplasma, allí obtienen los nutrientes necesarios para sobrevivir en la célula hospedadora, las especies pertenecientes al GFM expresan la proteína de superficie Sca2 o RickA, que recluta el complejo Arp2/3, encargado de la polimerización actina en la célula hospedadora, permitiendo el desplazamiento de la bacteria a través del citoplasma y de la membrana celular hacia la célula endotelial adyacente Figura 3 (Mansueto, Vitale et al. 2012). Las especies pertenecientes al grupo del tifo, no son eficientes en la polimerización de actina, ya que carecen gen que codifica para la proteína RickA, y usan la lisis de las células como medio para propagarse e infectar las células adyacentes (Gillespie, Kaur et al. 2015)

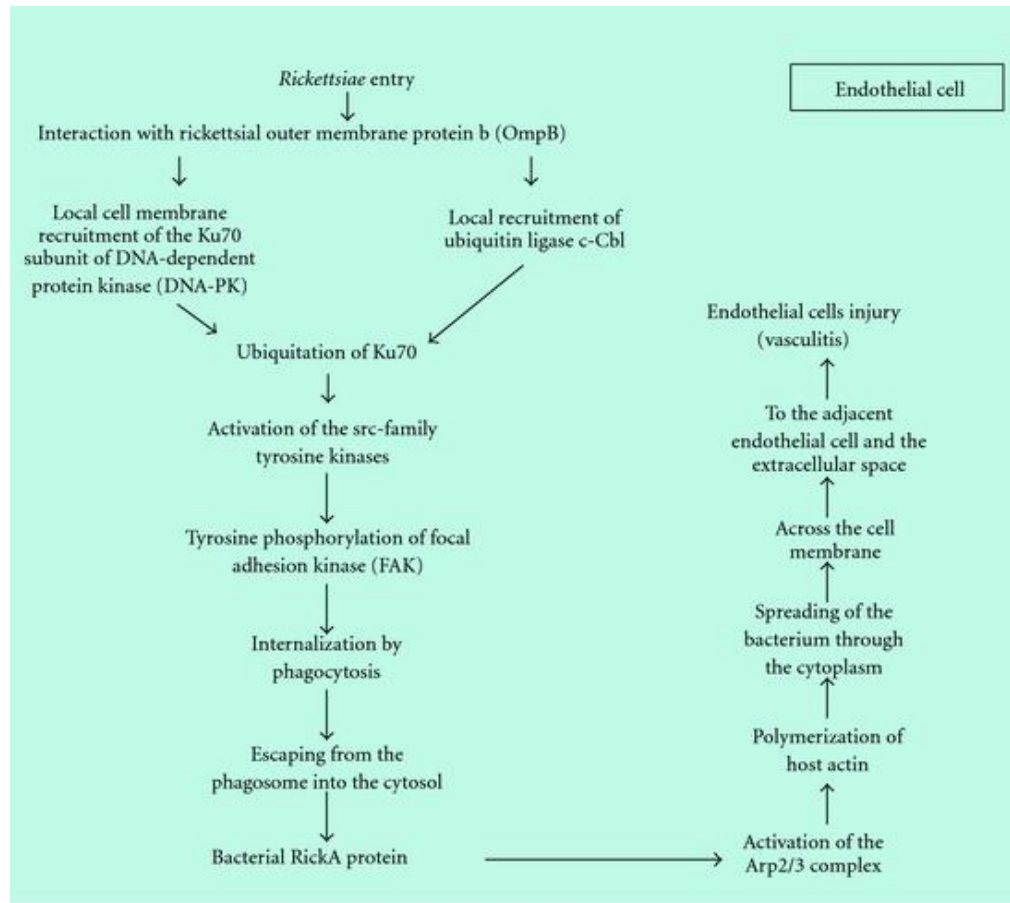


Figura 3. Entrada de *Rickettsia* a la célula diana (Mansueto, Vitale et al. 2012)

3.1.4 Relación vector-artrópodo y *Rickettsias*

Según lo reportado en la literatura los principales vectores involucrados en la transmisión de bacterias del género *Rickettsia* son garrapatas, pulgas piojos y ácaros (Olano 2005).

Las garrapatas son artrópodos pertenecientes al orden: Parasitiformes, clase: Arachnida, subclase: Acari, que comprende las familias: Ixodidae, Argasidae, y Nuttalliellidae. La familia Ixodidae o también conocida como garrapatas duras y conformada por los géneros *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor*, y *Amblyomma*, ha

sido identificada como vector de *Rickettsia* spp. (Parola, Paddock et al. 2013). Las garrapatas han sido descritas como hospedadores naturales de este género bacteriano y pueden mantener la infección por transmisión transovarial y transestadial, la infección a los hospederos se da durante su proceso de alimentación sanguínea al inocular saliva contaminada durante la picadura (Merhej, Angelakis et al. 2014).

Las pulgas son artrópodos pertenecientes a la clase: Insecta, subclase: Pterygota, Orden; Siphonaptera (Bitam, Dittmar et al. 2010), se han reportado aproximadamente 2574 especies y sub especies en el mundo (Azad, Radulovic et al. 1997, Bitam, Dittmar et al. 2010). Las especies de pulgas comúnmente conocidas por su relación con la transmisión de bacterias del género *Rickettsia* son: *Xenopsylla cheopis* (pulga de rata oriental), común en muchos ambientes tropicales y cálidos templados en todo el mundo, y principal vector de *R. typhi*; y *C. felis* (pulga del gato), extremadamente común en los perros y gatos en muchas regiones templadas y tropicales y descrita como vector de *R. felis* (Bitam, Dittmar et al. 2010). Las pulgas adquieren la infección por su proceso de alimentación y pueden transmitir la bacteria a su descendencia transovaricamente hasta 12 generaciones, la transmisión de la infección a un nuevo hospedero se da por el contacto con heces contaminadas a través de conjuntivas, mucosas o abrasiones en la piel (Blanton and Walker 2017).

Los piojos pertenecen a la clase: Insecta, subclase: Pterygota, súper orden: Psocodea, que se encuentra conformada por los órdenes: Psocoptera y Phthiraptera (Raoult, Roux et al. 1997). Se han descrito más de 3000 especies de piojos, pero solo dos *Pediculus humanus* y *Phthirus pubis* (piojos púbicos) tienen como huésped de

preferencia el humano. *Pediculus humanus* está compuesto por dos morfotipos *Pediculus humanus capitis* y *Pediculus humanus corporis*, siendo este último el vector de *R. prowazekii* (Raoult, Roux et al. 1997). La transmisión de *R. prowazekii* se produce por inoculación de materia fecal de piojos infectados, en mucosas, conjuntivas o abrasiones en la piel (Bechah, Capo et al. 2008).

Los ácaros son un grupo de artrópodos compuestos por tres órdenes: Mesostigmata, Trombidiformes y Sarcoptiformes. *Lyponyssoides sanguineus*, un ácaro del orden mesostigmatido que parasita el ratón doméstico (*Mus musculus*) podría actuar como un vector para *R. akari*, el agente de la viruela rickettsial (Merhej, Angelakis et al. 2014). Se transmite a humanos a través de la mordedura de *L. sanguineus*. Entre los ácaros la transmisión de *R. akari* puede ocurrir transovárica o transestadialmente.

3.2 Rickettsiosis transmitidas por pulgas

3.2.1 Generalidades de las pulgas.

Las pulgas son insectos pequeños, de color marrón rojizo, sin alas, con un cuerpo comprimido lateralmente y un tercer par de patas pronunciadas adaptadas a saltar (Mumcuoglu and Ruffli 1979). Son holometábolos con metamorfosis completa, los estadios adultos son hematófagos obligados, el 94% de las especies parasitan mamíferos y el 6% restante aves. Las larvas son alargadas, no poseen ojos; normalmente no son parásitos pero se alimentan de material orgánico del nido del huésped o de materia fecal de los estadios adultos (Lewis 1993).

Las pulgas se encuentran clasificadas en la clase: Insecta, subclase: Pterygota, Orden; Siphonaptera (Bitam, Dittmar et al. 2010). Existen aproximadamente 2574

especies, clasificadas en 16 familias y 238 géneros, pero solo una pequeña parte es sinantrópica, es decir que tiene una relación con los humanos (Bitam, Dittmar et al. 2010). La mayoría de pulgas de importancia médica o veterinaria son miembros de la familia *Pulicidae*, sin embargo, existen algunas especies de las familia *Tungidae*, *Ceratophyllidae*, *Leptopsyllidae* y *Vermipsyllidae*, que también han sido reportadas con importancia médica o veterinaria (Durden and Hinkle 2019).

La morfología en su estadio de larva, es delgada, blanca y segmentada con forma de gusano, están recubiertas con escasos pelos cortos y miden 1-2mm (Bitam, Dittmar et al. 2010) (Figura 4), no poseen ojos, patas, ni otras características morfológicas notorias, sin embargo, poseen partes bucales mordaces. Durante su estadio larvario pasan por tres etapas de duración variable, según la disponibilidad de alimentos, porcentajes de humedad relativa y otras condiciones medio ambientales. Se mueven libremente y se alimentan de detritos o desechos orgánicos que encuentran en el ambiente, se conoce que también pueden alimentarse de heces fecales de pulgas adultas. Las pulgas en su estadio larvario son negativamente fototácticas es decir que evitan la luz, y positivamente geotrópicas por lo que prefieren desplazarse hacia abajo, se alojan comúnmente en las fibras de alfombras, colchones, en el material interno de muebles, en áreas donde el animal que se encuentran parasitando pase gran cantidad de tiempo (Bitam, Dittmar et al. 2010).



Figura 4. Larva de *C. felis* (Durden and Hinkle 2019)

Durante el estadio de pupa, las pulgas son ovoides, blancas y están típicamente rodeadas por una capa de seda secretada durante el último estadio larvario, la naturaleza pegajosa de esta seda, permite que se adhieran restos de sustratos y ayuden a camuflarla (Durden and Hinkle 2019) Figura 5. Este estadio puede durar varias semanas, e incluso hasta un año en condiciones poco comunes, mientras detecta el estímulo adecuado para emerger, es por esta razón que se puede prolongar el ciclo de vida y genera un problema desde el punto de vista de control.

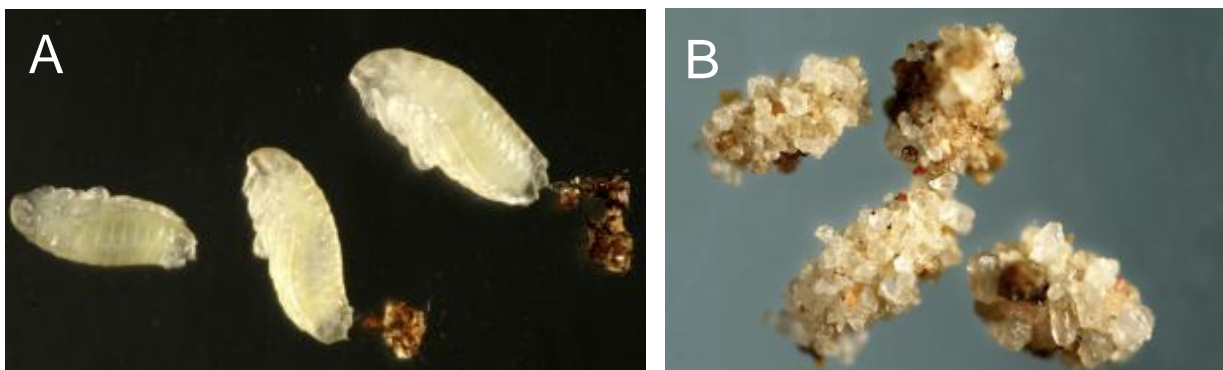


Figura 5. A) Estadío pupa *C. felis*. B) Pupa de *C. felis* recubierta por sustratos y detritos (Durden and Hinkle 2019).

Las pulgas como todos los insectos tienen su cuerpo dividido en tres zonas: cabeza, tórax y abdomen (Lewis 1993) (Figura 6), en su estadio adulto son pequeñas, miden

1-8mm, se caracterizan tener cuerpos delgados y aplanados lo que les permite deslizarse fácilmente entre el pelaje de los animales (Bitam, Dittmar et al. 2010, Durden and Hinkle 2019), las pulgas recién emergidas de la pupa, se ven atraídas a los hospederos por estímulos como calor, movimiento y dióxido de carbono: las pulgas pueden sobrevivir algún tiempo si no encuentran un huésped, que dependerá de la especie la temperatura y humedad. Las pulgas en estadio adulto representan el 5% de la población total de pulgas (Bitam, Dittmar et al. 2010).

Las pulgas poseen antenas cortas, situadas en los surcos laterales; el tórax está compuesto por tres segmentos, cada uno con un par de patas, de las que se pueden distinguir varias características: una coxa basal, un trocanter pequeño, fémur, tibia y tarso; el tarso se encuentra dividido en cinco segmentos denominados tarsómeros- Las patas traseras están compuestas por una proteína elastomérica denominada resilina que se comprime durante la flexión de la coxa en el metatórax y luego se relaja rápidamente lo que les permite saltar hasta 150 veces la longitud de su cuerpo (Bitam, Dittmar et al. 2010). Los segmentos abdominales se encuentran divididos en 10 tergitos dorsales y 8 esternitos ventrales. (Bitam, Dittmar et al. 2010)

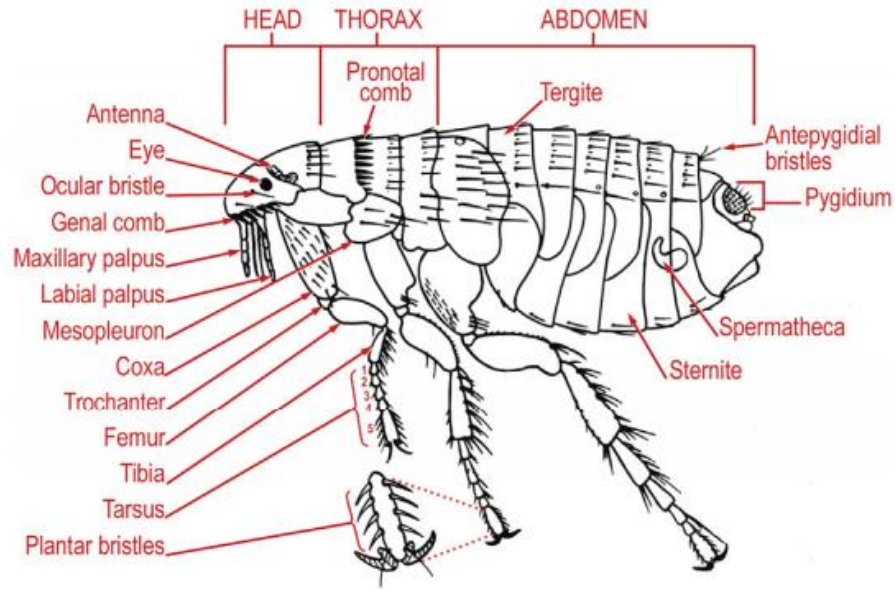


Figura 6. Morfología general de una pulga adulta (Hembra) (Durden and Hinkle 2019).

Las pulgas, son insectos homometábolos. (Bitam, Dittmar et al. 2010, Durden and Hinkle 2019). Las hembras en la mayoría de las especies pueden producir cientos de huevos durante su vida, y estos suelen eclosionar a los 5 días. Los huevos pueden adherirse suavemente al pelaje del hospedero o caer al nido o cama, donde nacen las larvas algunos días después, las larvas se alimentan de materia orgánica o heces fecales de pulgas adultas que son generalmente ricas en sangre.

Durante dos o tres semanas se desarrollan los tres estadios larvarios, y al final de este periodo durante la última muda se envuelven en capullos de seda producidos por sus glándulas salivales, a las que se adhieren polvo y otras partículas; luego de dos o tres días la larva o prepupa se transforma en pupa. La etapa pupal tendrá una duración que dependerá de las condiciones medio ambientales, pero generalmente se estima en dos semanas. La pulga adulta, dependerá de un estímulo para salir de la cutícula pupal (Lewis 1993).

3.2.2 Tifo murino

El tifo murino, es una zoonosis mundial también conocida como como tifus transmitido por pulgas, tifus urbano o tifus endémico, cuyo agente causal es *R. typhi* (anteriormente *Rickettsia mooseri*); esta bacteria es transmitida principalmente desde un reservorio mamífero (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) a través de un artrópodo, en este caso por pulgas *Xenopsylla cheopis* (Bitam, Dittmar et al. 2010). Sin embargo, se ha demostrado durante los últimos años en el sur de Texas que en ciclo zoonótico de esta enfermedad puede involucrar zarigüeyas y pulgas de gato (*C. felis*) (Boostrom, Beier et al. 2002).

R. typhi infecta principalmente las células endoteliales de mamíferos y células epiteliales del intestino medio de la pulga. La pulga se infecta cuando se alimenta de sangre contaminada, las Rickettsias se alojan en las células del intestino medio de la pulga, y pueden ser detectadas tres o cuatro días después de la infección, pero deben transcurrir aproximadamente diez días antes que la pulga pueda transmitir la bacteria a sus hospederos (Azad, Radulovic et al. 1997). La pulga permanece infectada durante toda su vida, pero esta condición no afecta su ciclo de vida ni su reproducción (Balleydier, Camuset et al. 2015), teniendo en cuenta que la bacteria infecta células del intestino medio de la pulga, ésta es liberada al lumen intestinal y es excretada en las heces de la pulga (Noden, Radulovic et al. 1998). La bacteria es transmitida a los humanos cuando se inoculan mediante abrasiones en la piel las heces de la pulga. Adicional a los procesos de transmisión horizontal (Pulga-Vertebrado; Vertebrado-

Pulga), la bacteria se mantiene en las pulgas por transmisión transovárica o trans-estadial.

El tifo murino tiene un periodo de incubación de seis a 14 días aproximadamente (Bitam, Dittmar et al. 2010), sus manifestaciones clínicas son inespecíficas, los pacientes suelen presentar un inicio repentino de fiebre, dolor de cabeza, mialgias, escalofríos, debilidad y náuseas (Bitam, Dittmar et al. 2010, Blanton and Walker 2017, Fang, Blanton et al. 2017). Se describe que los pacientes pueden presentar una erupción cutánea macular (49%), maculopapular (29%), papular (14%), petequial (6%) y morbiliforme (3%), generalmente distribuida en el tronco (Bitam, Dittmar et al. 2010). Dicha erupción cutánea, se reporta presente en tan solo el 20% de los individuos con pigmentación oscura y hasta en el 80% de pacientes con piel ligeramente pigmentada (Fang, Blanton et al. 2017).

El tifo murino frecuentemente se manifiesta con algunos síntomas gastrointestinales como: anorexia, náuseas, vómito y dolor abdominal, y en casos graves puede complicarse por disfunción pulmonar, renal y neurológica (Blanton and Walker 2017). Se ha reportado que la gravedad de la infección por tifo murino, se encuentra asociada con la vejez, el diagnóstico tardío, disfunción hepática y renal así como anomalías del sistema nervioso central (Boostrom, Beier et al. 2002). Se ha reportado que aproximadamente el 4% de los pacientes hospitalizados por esta causa mueren (Blanton and Walker 2017).

La prueba de oro para el diagnóstico de tifo murino, corresponde al ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), que permite detectar anticuerpos IgG e IgM en

muestras de suero, sin embargo, de acuerdo con el Centro Colaborador de Enfermedades Rickettsiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera un caso positivo confirmado, cuando existe una seroconversión o un aumento de por lo menos 4 veces el título obtenido en la fase aguda en la fase convaleciente (Balleydier, Camuset et al. 2015). Sin embargo, la necesidad de pruebas en fase de convalecencia (15 días), dificulta el establecimiento de un diagnóstico definitivo en la fase aguda de la enfermedad (Basra, Berman et al. 2012).

Teniendo en cuenta los altos índices de reactividad cruzada entre diferentes especies de *Rickettsia*, el Western blot permite diferenciar los resultados verdaderamente positivos de los falsos positivos, ya que es más sensible y específica para detectar anticuerpos en la fase aguda de la enfermedad (La Scola, Rydkina et al. 2000).

Según lo descrito por Blanton *et al.* 2017, el aislamiento del agente etiológico es la evidencia definitiva de la enfermedad, sin embargo, se requieren laboratorios con alto nivel de complejidad para el aislamiento (Blanton and Walker 2017). El cultivo permite el aislamiento de *Rickettsia* en cultivos celulares convencionales, el uso de esta técnica asegura el diagnóstico y permite la identificación de nuevas especies (La Scola, Rydkina et al. 2000, Badiaga, Benkouiten et al. 2012).

El diagnóstico por técnicas de biología molecular, está basado en la amplificación de genes altamente conservados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de sangre, los genes más usados para la detección de *Rickettsia typhi*, en el diagnóstico de tifo murino son *gltA*, *ompB* y *rrs*. La PCR es útil en la diferenciación de especies de *Rickettsia* (Azad, Radulovic et al. 1997, La Scola, Rydkina et al. 2000).

Esta técnica permite dar un diagnóstico antes de la seroconversión, sin embargo, se requiere de un laboratorio especializado.

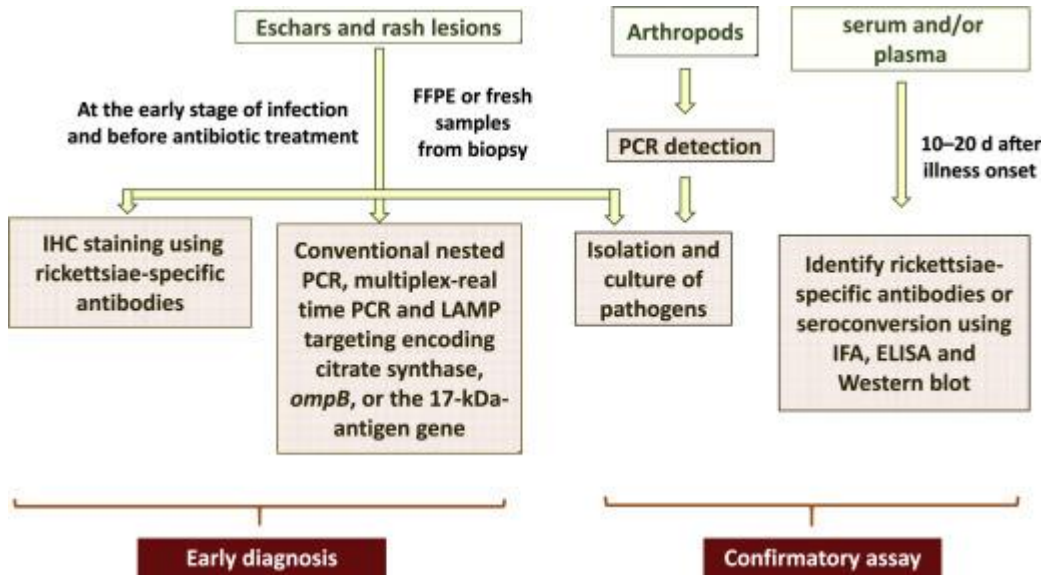


Figura 7. Algoritmo de diagnóstico para enfermedades Rickettsiales. (Fang, Blanton et al. 2017)

El tifo murino es endémico en zonas costeras y puertos de diversas partes del mundo, es una de las infecciones transmitidas por vectores más ampliamente distribuidas, se han reportado brotes en Australia, China, Grecia, Israel y Tailandia. Es endémico en el estado de Texas en Estados Unidos (Blanton and Walker 2017). La eliminación de la enfermedad se basa en el control de roedores y vectores.

El tratamiento con doxiciclina, es la principal elección para las rickettsiosis, la fiebre disminuye generalmente entre 48 y 72 horas después de iniciado el tratamiento. Se ha reportado que el uso de cloranfenicol y fluoroquinolonas también es efectivo (Bitam, Dittmar et al. 2010, Blanton and Walker 2017).

3.2.3 Fiebre manchada transmitida por pulgas

La fiebre manchada transmitida por pulgas, es una enfermedad endémica causada por *R. felis*, esta bacteria fue descrita por primera vez en 1918 y redescubierta en 1990 a partir de pulgas de gato *C. felis* (Adams, Schmidtman et al. 1990) e identificada como patógeno para los humanos en los Estados Unidos en 1994 a partir de una muestra de sangre de un paciente con un cuadro clínico similar al de tifo murino (Boostrom, Beier et al. 2002). Debido a que su caracterización molecular inicial se llevó a cabo en EL Laboratory en Soquel, California, se denominó inicialmente agente ELB, posteriormente al haber sido identificada en pulgas *C. felis* fue llamada *R. felis* (Znazen and Raoult 2007).

R. felis se encuentra clasificada dentro del grupo transicional (Fuxelius, Darby et al. 2007), ya que comparte características con algunas especies del grupo del tifo (los anticuerpos producidos contra *R. felis* tienen reactividad cruzada con *R. typhi* y es transmitida por pulgas), y con el GFM (el análisis común de los genes *htrA* y *16S rRNA* la clasifican en este grupo) (Znazen and Raoult 2007).

La infección es adquirida por los seres humanos, cuando se inoculan heces de las pulgas infectadas mediante abrasiones en la piel, se ha reportado que también se puede adquirir la infección por contacto con mucosas o conjuntivas (Azad, Radulovic et al. 1997). Una vez la bacteria ingresa, se disemina por el torrente sanguíneo, infectando las células endoteliales que los recubren los vasos sanguíneos. *R. felis* porta genes que codifican para las proteínas Sca, lo que permite su unión a la célula diana, y la realización de fagocitosis inducida, la polimerización de los filamentos de

actina es posible en esta especie, ya que *R. felis* es portadora de un gen homólogo para la proteína *actA* (Znazen and Raoult 2007).

Se ha descrito la presencia de esta especie bacteriana en todos los continentes, excepto en la Antártida, la mayoría de los estudios han sido publicados después del 2002, gracias a las herramientas de biología molecular que han facilitado la identificación génica. Aunque en la última década, se han realizado avances sobre la biología básica de *R. felis* aun los mecanismos de transmisión y epidemiología obstaculizan los avances en investigación de este patógeno emergente (Brown and Macaluso 2016).

Los patógenos rickettsiales transmitidos por insectos, cumplen el ciclo de transmisión horizontal más común de los patógenos transmitidos por vectores, que incluye tres componentes secuenciales: i) un artrópodo infectado inocula el patógeno a un hospedero vertebrado susceptible, ii) el hospedero vertebrado susceptible, desarrolla la infección sistema en el torrente sanguíneo, iii) un artrópodo sin contacto previo con el patógeno, lo adquiere del hospedero vertebrado mediante el proceso de alimentación sanguínea (Brown, Christofferson et al. 2015). La transmisión vertical de *R. felis* en pulgas, se determinó por la identificación por PCR de la bacteria en huevos de pulgas recién depositados (transmisión transovárica), así como de pulgas adultas en su última muda sin fecundar (transmisión transestadial) (Brown and Macaluso 2016).

El diagnóstico de *R. felis* se puede realizar mediante pruebas serológicas y moleculares; los métodos serológicos más comunes en el diagnóstico de esta bacteria

son IFI, ELISA y Western blot; y los métodos moleculares que se destacan son PCR para la detección de genes rickettsiales *OmpA*, *OmpB*, *gltA*, y el *gen D* en muestras de sangre y biopsias de piel y pulgas; seguidos de la digestión con enzimas de restricción (RFLP) y métodos de secuenciación para la identificación de la especie de *Rickettsia* involucrada (Parola, Sanogo et al. 2003, Blanton, Quade et al. 2019).

El tratamiento de elección para la fiebre manchada transmitida por pulgas, es doxiciclina como para las demás especies patógenas de *Rickettsia*, aunque también es efectivo el uso de fluoroquinolonas, telitromicina y rifampicina. *R. felis* es resistente a sulfametoxazol, eritromicina y β -lactámicos (Ogata, Renesto et al. 2005).

A pesar del avance en el conocimiento de *R. felis*, el mantenimiento de esta especie en la naturaleza aún no está dilucidado, se conoce que se encuentra prevalentemente en pulgas de gato *C. felis* en todo el mundo y se han reportado anticuerpos presentes en muestras de perros y gatos, sin embargo, su papel como reservorios aún no se ha investigado. La presencia de *R. felis* en otros artrópodos como garrapatas y diferentes especies de pulgas, se relaciona con la posibilidad de hallar pulgas de gato en zarigüeyas (Gillespie, Ammerman et al. 2009).

La capacidad patogénica de *R. felis* aún no está claramente establecida, teniendo en cuenta que no se ha logrado aislar la bacteria en cultivo celular a partir de muestras de humanos sintomáticos, y que posee algunas características importantes de un organismo simbiótico, entre las que se encuentran un tamaño de genoma de 1,48 Mb, con alta capacidad de codificación (83%), típico de bacterias simbióticas. Según lo reportado por Merhej *et al.* 2014 las especies patógenas de *Rickettsia* poseen un

genoma de menor tamaño que las no patógenas (Merhej, Georgiades et al. 2013). *R. felis* además, se ha reportado en una gran variedad de especies de artrópodos, entre los que se encuentran: pulgas, garrapatas, mosquitos y artrópodos no hematófagos como el piojo del libro, en este último se caracteriza por formar micetomas, una particularidad de endosimbiontes bacterianos (Labruna and Walker 2014).

Durante la última década, estudios realizados en África han demostrado la circulación en pulgas de nuevas especies de *Rickettsia*, similares a *R. felis*. El estudio realizado en Asembo, Kenia, por Jiang *et al.* 2013, determinó la circulación de un nuevo agente rickettsial transmitido por pulgas e identificó por primera vez *Candidatus Rickettsia asemonensis* en pulgas *C. felis*. Esta especie comparte un porcentaje de identidad del 99% en el gen *rrs*, 99,6% con *gltA*, 92,3% con *ompA*, 94,8% con *ompB*, 94,4% con *sca4*, con las cepas reportadas para *R. felis*. Los análisis filogenéticos caracterizaron la especie dentro del grupo ancestral, cerca de *R. felis* (Jiang, Maina *et al.* 2013). Estudios posteriores realizados para la identificación de la especie, lograron el aislamiento y cultivo en líneas celulares (Luce-Fedrow, Maina *et al.* 2015).

Paralelamente otro grupo en África, ubicado en Senegal, estudio las rickettsiosis transmitidas por pulgas en la ciudad de Dakar, e identificaron en las pulgas y los cultivos infectados, muestras positivas similares a *R. felis*, sin embargo, no obtuvieron resultados positivos para el gen *ompA*, la especie obtenida presentó los siguientes porcentajes de identidad con *R. felis* cepa California 2 (CP000053): 99,65% con *rrs*, 97,68% con *gltA*, 95,24% con *ompB* y 97,2% con *sca4*. La especie fue caracterizada e identificada como *Candidatus Rickettsia senegalensis* (Mediannikov, Aubadie-Ladrix

et al. 2015). Sin embargo, la patogenicidad de estas especies no se ha logrado establecer (Hornok, Baneth et al. 2018).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de rickettsiosis transmitidas por pulgas en humanos e identificar molecularmente especies de *Rickettsia* spp. en pulgas recolectadas sobre perros y gatos de zonas rurales priorizadas del departamento del Cauca.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar la seroprevalencia de rickettsiosis transmitidas por pulgas en humanos de Caloto, La Sierra, El Tambo y Santander de Quilichao
- b) Determinar la presencia de genes rickettsiales en muestras de sangre de perros y gatos de Caloto, La Sierra, El Tambo y Santander de Quilichao
- c) Identificar las especies de *Rickettsia* spp. presentes en pulgas de perros y gatos de Caloto, La Sierra, El Tambo y Santander de Quilichao

5 METODOLOGÍA

5.1 Área geográfica de estudio

El departamento del Cauca tiene una extensión de 29.308 Km², se encuentra ubicado al sur occidente del país, en las regiones Andina y Pacífica, localizado entre: 00°58'54" y 03°19'04" de latitud norte 75°47'36" y 77°57'05" de longitud oeste <https://www.todacolombia.com/departamentos-de-colombia/cauca/index.html>, limita al norte con el departamento del Valle del Cauca , al oriente con Huila, Tolima y Caquetá, al sur con Putumayo y Nariño, y al occidente con el Océano Pacífico.

El departamento del Cauca tiene una población de 1.416.145 habitantes, por lo que se considera el décimo departamento más poblado de Colombia, según estimó el DANE para 2017, http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/proyepobla0620/Edades_Simples_1985-2020.xls se encuentra dividido en 42 municipios distribuidos en 5 subregiones: Provincia de Oriente conformada por: Caldono, Inzá, Jambaló, Páez, Puracé, Silvia, Toribío, Totoró; Provincia de Occidente: Guapí, López, Timbiquí; Provincia del Sur: Almaguer, Argelia, Balboa, Bolívar, Florencia, La Vega, Mercaderes, Patía, Piamonte, San Sebastián, Santa Rosa, Sucre; Provincia del Centro: Cajibío, El Tambo, La Sierra, Morales, Piendamó, Popayán, Rosas, Sotará, Timbío; Provincia del Norte: Buenos Aires, Caloto, Corinto, Guachené, Miranda, Padilla, Puerto Tejada, Santander de Quilichao, Suárez, Villa Rica, Jambaló, Caldono, Toribío (Figura 8) https://moe.org.co/home/doc/moe_mre/caucalibro.pdf.

Para realizar este estudio, se seleccionaron 7 veredas, pertenecientes a cuatro municipios de acuerdo a los reportes de presencia de garrapatas y pulgas presentados

por los técnicos de zoonosis a la secretaria de Salud del departamento, dichas veredas fueron: Juana Castaña perteneciente al municipio de La Sierra ubicado a $2^{\circ}14'27.5''N$ $76^{\circ}53'55.1''O$; El Zarzal, El Placer y Betania localizadas en el municipio de El Tambo, ubicadas a $2^{\circ}27'27.4''N$ $76^{\circ}43'50.7''O$, $2^{\circ}25'10.3''N$ $76^{\circ}47'12.8''O$ y $2^{\circ}28'47.1''N$ $76^{\circ}48'25.2''O$ respectivamente; Lomitas Arriba y Lomitas Abajo localizadas en el municipio Santander de Quilichao, ubicadas a $3^{\circ}03'35.7''N$ $76^{\circ}33'01.5''O$ y $3^{\circ}04'32.5''N$ $76^{\circ}33'29.1''O$ respectivamente y el Resguardo Huellas perteneciente al municipio de Caloto localizado a $2^{\circ}59'34.0''N$ $76^{\circ}21'56.4''O$ -



Figura 8. Distribución Política del departamento del Cauca, modificado de: https://moe.org.co/home/doc/moe_mre/caucalibro.pdf

5.2 Determinación de seroprevalencia en humanos contra *Rickettsia* spp. transmitida por pulgas.

Se tomaron muestras de sangre de adultos sanos, en las siete veredas pertenecientes a los cuatro municipios previamente mencionados, el tamaño de muestra fue obtenido teniendo en cuenta el tamaño de la población y los valores estadísticos de 95% de intervalo de confianza y un error esperado del 5%, todos los participantes firmaron libre y voluntariamente el consentimiento informado, avalado por el comité de ética de la Pontificia Universidad Javeriana (Anexo 1), así como el diligenciamiento de una encuesta de datos personales (Anexo 2).

Las muestras de suero fueron enviadas cumpliendo con la cadena de frío, al Laboratorio de Bacteriología Especial de la Pontificia Universidad Javeriana, para su conservación a -20°C hasta su procesamiento.

Con el fin de determinar y titular anticuerpos IgG contra *R. typhi* y *R. felis*, se realizó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando laminas antigenadas con *R. typhi* donadas por la Dra. Karla Dzul de la Universidad Autónoma de Yucatán y con *R. felis* donadas por la Universidad de Texas Medical Branch, siguiendo el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Bacteriología Especial, teniendo en cuenta como punto de corte una dilución de 1:64. Como controles positivos se utilizaron sueros reactivos para las dos especies, obtenidas de humanos de un estudio previo (Ramírez-Hernández, Montoya et al. 2013). El anti-anticuerpo utilizado para la detección de anticuerpos IgG de Humano fue el "Donkey Anti-Human IgG Antibody (Alexa Fluor 488) (Jackson ImmunoResearch Lab MS)

5.3 Detección molecular de especies de Rickettsias en ADN extraído de sangre y pulgas de animales domésticos.

5.3.1 Recolección de las muestras de sangre de animales domésticos

Se tomaron muestras de sangre de perros y gatos de las siete veredas, entre los meses de agosto y noviembre de 2017, manteniendo una relación de 50 perros y 20 gatos por cada humano, dicho muestreo fue autorizado previamente con la firma del consentimiento por los propietarios; las muestras fueron conservadas en cadena de frío durante su envío al Laboratorio de Bacteriología Especial, donde se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

5.3.2 Extracción de ADN de muestras de sangre

La extracción de ADN de las muestras de sangre recolectadas se realizó utilizando el estuche comercial *DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen™)*, siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se realizó la cuantificación de ADN con el espectrofotómetro Nano Genius verificando la concentración en ng/ μ l.

5.3.3 Evaluación del ADN extraído de Sangre

Para verificar la calidad del ADN extraído y la ausencia de inhibidores, se amplificó el gen de la β -actina por la técnica de PCR utilizando los iniciadores Actin-FWD-Actin-REV (du Breuil, Patel et al. 1993) y utilizando enzima Go Taq Green MasterMix® (Promega), la secuencia de los iniciadores, el tamaño del producto esperado y las condiciones de la PCR están descritas en la Tabla 1. El producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seakean, Lonza,

USA) en tampón 1 x Tris Borato EDTA® (TBE) y visualizado con SYBR®safe como agente intercalante (Invitrogen™, Life Technologies Corp., Grand Island, NY), la imagen se obtuvo utilizando el fotodocumentador (Gel Doc™ XR + Gel Documentation System, BIO RAD). Se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH). El control negativo utilizado fue agua, garantizando que no se encontrara contaminación en los reactivos.

Tabla 1. Iniciadores y protocolo de PCR para el gen β -actina (du Breuil, Patel et al. 1993)

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño Producto
β -actina	Actin-FWD	CGGAACCGCTCATTGCC	289 pb
	Actin-REV	GCTCACTCAGTGTGGCAAAG	
Condiciones PCR			
1 ciclo	Denaturación	95°C	4 minutos
35 ciclos	Denaturación	94°C	30 segundos
	Anillamiento	57°C	30 segundos
	Extensión	72°C	60 segundos
1 ciclo	Extensión	72°C	5 minutos

5.3.4 Recolección de las muestras de pulgas de animales domésticos y roedores

Entre Agosto y Noviembre de 2017, se realizó la toma de muestra de pulgas del pelaje de perros y gatos domésticos de forma manual, mediante cepillado del pelaje; los artrópodos recolectados fueron depositados en tubos plásticos de 1,5ml con alcohol al 70%, y rotulados con el código del animal, posteriormente fueron enviados al

Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad de la Salle en Bogotá, donde fueron clasificados taxonómicamente utilizando las claves sugeridas por Linardi *et al.* 2012 (Linardi and Santos 2012), y posteriormente enviados al Laboratorio de Bacteriología Especial donde fueron procesados.

5.3.5 *Clasificación taxonómica de pulgas capturadas sobre animales domésticos.*

La clasificación taxonómica de las pulgas recolectadas sobre animales domésticos, se realizó utilizando claves taxonómica (Linardi and Santos 2012); una vez clasificadas, fueron organizadas por pooles teniendo en cuenta: la especie de pulga, el estadio y el animal que se encontraban parasitando, los pooles contenían entre 1 y 5 especímenes, de acuerdo a los protocolos estandarizados en el Laboratorio de Bacteriología Especial.

5.3.6 *Extracción de ADN de pulgas*

Una vez clasificadas y organizadas en pooles, las muestras de pulgas fueron lavadas con etanol al 70%, llevadas a bloque seco a 65°C hasta su secado, y maceradas en 40 µl PBS 1X. Una vez logrado un macerado homogéneo, las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

La extracción de ADN se realizó utilizando el estuche comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen™), con una modificación para la lisis de quitina utilizando Tiocianato de Guanidina (DNAzol; Invitrogen™, Life Technologies Corp., Grand Island, NY), la cuantificación de ADN se realizó con el espectrofotómetro Nano Genius.

5.3.7 Evaluación del ADN extraído de pulga

Para verificar de la calidad de ADN extraído de pulgas y la ausencia de inhibidores, se amplificó por PCR el gen de la β -actina utilizando los iniciadores Actin-FWD y Actin-REV (du Breuil, Patel et al. 1993), utilizando enzima Go Taq Green MasterMix® (Promega), la secuencia de los iniciadores, el tamaño del producto esperado y las condiciones de la PCR están descritas en la Tabla 1. El producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seakean, Lonza, USA) en tampón 1 x Tris Borato EDTA® (TBE) y se visualizó con SYBR®safe como agente intercalante (Invitrogen™, Life Technologies Corp., Grand Island, NY), la imagen se obtuvo utilizando el fotodocumentador (Gel Doc™ XR + Gel Documentation System, BIO RAD). Se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH). El control negativo utilizado fue agua, garantizando que no se encontrara contaminación en los reactivos.

5.3.8 Detección molecular de especies de *Rickettsias* en ADN extraído de sangre y pulgas de animales domésticos.

Para determinar la presencia de genes rickettsiales en el ADN extraído tanto de sangre como de pulgas procedentes de animales domésticos, se realizó un tamizaje por PCR en tiempo real para la identificación del gen *gltA*, se utilizó enzima PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), los iniciadores CS-5 y CS-6 (Labruna, Whitworth et al. 2004), las condiciones de la PCR se describen en la Tabla 2. Para la confirmación de especies de *Rickettsia* spp. presentes en las muestras, las muestras positivas para *gltA* fueron analizadas utilizando PCR convencional para los genes

rickettsiales *ompB* y 17KDa (Roux and Raoult 2000; Schriefer, Sacci et al. 1994), con la enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation), los iniciadores y las condiciones de la PCR se describen en las Tablas 3 y 4. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seakean, Lonza, USA) en tampón 1 x Tris Borato EDTA® (TBE) y visualizados con SYBR®safe como agente intercalante (Invitrogen™, Life Technologies Corp., Grand Island, NY), utilizando para su visualización el fotodocumentador (Gel Doc™ XR + Gel Documentation System, BIO RAD). Se utilizó el marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH). Como control positivo se utilizó el ADN de *Rickettsia slovaca* y agua como control negativo de la reacción

Tabla 2. Iniciadores y condiciones de PCR para el gen *gltA* de *Rickettsias* (Labruna, Whitworth et al. 2004)

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Metodología
<i>gltA</i>	CS-5	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT	SYBR-Green
	CS-6	AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	
Condiciones PCR			
1 Ciclo	Denaturación	94°C	2 Minutos
40 Ciclos	Denaturación	94°C	15 Segundos
	Anillamiento	55°C	30 Segundos
	Extensión	72°C	30 Segundos
Curva Melt		95°C	15 Segundos
		60°C	60 Segundos

	95°C	15 Segundos
--	------	-------------

Tabla 3. Iniciadores y condiciones de PCR para el gen 17kD (Schriefer, Sacci et al. 1994).

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño Producto
17kD	17kD1	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	433
	17kD2	CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG	
Condiciones PCR			
40 Ciclos	Denaturación	94°C	30 segundos
	Anillamiento	57°C	2 Minutos
	Extensión	70°C	2 Minutos

Tabla 4. Iniciadores y condiciones de PCR para el gen ompB (Roux and Raoult 2000)

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño Producto
ompB	120-3599	TACTTCCGGTTACAGCAAAGT	812
	120-2788	AAACAATAATCAAGGTACTGT	
Condiciones PCR			
1 Ciclo	Denaturación	95°C	3 Minutos
40 Ciclos	Denaturación	95°C	30 Segundos
	Anillamiento	52°C	30 Segundos
	Extensión	72°C	90 Segundos
1 Ciclo	Extensión	72°C	7 Minutos

5.3.9 Digestión con endonucleasas.

Para identificar las especies de *Rickettsia* spp. que estaban presentes en las pulgas recolectadas, se utilizaron dos protocolos: El primero basado en el uso de la enzima de restricción *XbaI* sobre los productos amplificados para el gen *17KDa* y el segundo basado en el uso de la enzima *NlaIV* sobre el producto amplificado para el gen *ompB*.

El protocolo basado en el uso de *XbaI* permite diferenciar *R. typhi* de *R. felis* y RFLO's (Schriefer, Sacci et al. 1994), el corte de 216pb del producto amplificado de 433pb, permitiría identificar *R. typhi* y la ausencia de corte *R. felis* o RFLO's; se realizó la digestión de los pooles positivos para el gen *17KDa* tomando: 1 Unidad de la enzima *XbaI* (New England Biolabs®), 1 µL del Buffer, 2,5 µL producto amplificado del gen *17KDa* y 5,5 µL de agua a 37°C por 1 hora, el segundo protocolo descrito por Quade et al. en la 29ª Reunión de la Sociedad Americana de Rickettsiología, llevada a cabo del 16-19 de Junio de 2018 en Milwaukee (Wi), en donde describen que la digestión con la enzima *NlaIV* (New England Biolabs®) de los productos amplificados para el gen *ompB* con los iniciadores 120-2788 y 120-3599 permite diferenciar *R. typhi*, *R. felis*, y RFLO (Tabla 5). Se realizó la digestión de todos los pooles positivos para el el gen *ompB*, utilizando 1 Unidad de la enzima de restricción, 1 µL del Buffer, 2,5 µL producto amplificado y 5.5 µL de agua a 37°C por 1 hora. Los productos digeridos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% % (Seakean, Lonza, USA) en paralelo con marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH); en tampón 1x Tris Borato EDTA® (TBE) y visualizados con SYBR®safe como agente intercalante (Invitrogen™, Life

Tecnologies Corp., Grand Island, NY), mediante fotodocumentador (Gel Doc™ XR + Gel Documentation System, BIO RAD).

Tabla 5. Perfiles de restricción para especies de *Rickettsia* spp. para el gen *ompB* usando la enzima *NlaIV*

Espece de <i>Rickettsia</i> spp.	Número de bandas	Tamaño Bandas (pb)
<i>R. asemboensis</i>	2	469, 301
<i>Candidatus R. senegalensis</i>	2	661, 109
<i>R. felis</i>	1	814
<i>R. typhi</i>	2	760, 82

5.3.10 Secuenciación de productos amplificados

Un pool identificado con cada patrón de restricción fue enviado al Laboratorio de secuenciación de ADN de la Universidad de los Andes, las secuencias obtenidas sufrieron un alineamiento nucleótido-nucleótido una base de datos de genomas *Rickettsiales* obtenida de NCBI Assembly a través de NCBI Taxonomy (Federhen 2012).

6 RESULTADOS

6.1 Muestras de suero

La recolección de muestras se realizó entre agosto y noviembre de 2017, se tomaron un total de 506 muestras de suero de adultos voluntarios, cuya distribución por vereda se observa en la Tabla 6; el tamaño de muestra fue calculado teniendo el número de adultos que habitaban la vereda y estimando el Intervalo de Confianza del 95% y un error cercano al 5%, sin embargo, no fue posible alcanzar el tamaño de la muestra, por lo que los resultados solo indicaran el % de prevalencia en la población analizada. Las muestras fueron recolectadas entre el 30 de agosto y el 10 de noviembre de 2017. Los resultados de seroprevalencia para *R. typhi* y *R. felis* se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Tamaños de muestra y seroprevalencia contra *R. typhi* y *R. felis* por vereda

Municipio	Vereda	Tamaño de muestra	de Muestras Recolectadas	<i>R. typhi</i> 1:64	<i>R. felis</i> 1:64
La Sierra	Juana	123	40	85%	47,5%
	Castaña			(34/40)	(19/40)
El Tambo	El Zarzal	206	130	60%	50,7%
				(78/130)	(66/130)
	El Placer	236	88	57%	60,22%
				(51/88)	(53/88)
	Betania	189	46	58,7%	43,4%
				(27/46)	(20/46)

Santander de Quilichao	Lomitas Arriba	245	68	64,7% (44/68)	30,9% (21/68)
	Lomitas Abajo	217	84	53,6% (45/84)	29,8% (25/84)
Caloto	Resguardo	207	50	53,6% (28/50)	40% (20/50)
	Huellas				

6.2 Detección de *Rickettsia* spp. en muestras de sangre de perros y gatos.

6.2.1 Recolección de las muestras de sangre de animales doméstico

La recolección de muestras de sangre de animales domésticos (perros y gatos), se realizó, teniendo en cuenta una relación de 1 perro por cada 20 humanos y un gato cada 50 humanos. Se recolectó un total de 121 muestras de perros y 4 de gatos, distribuidas en las 7 veredas en la Figura 9 se muestra la distribución de las muestras.

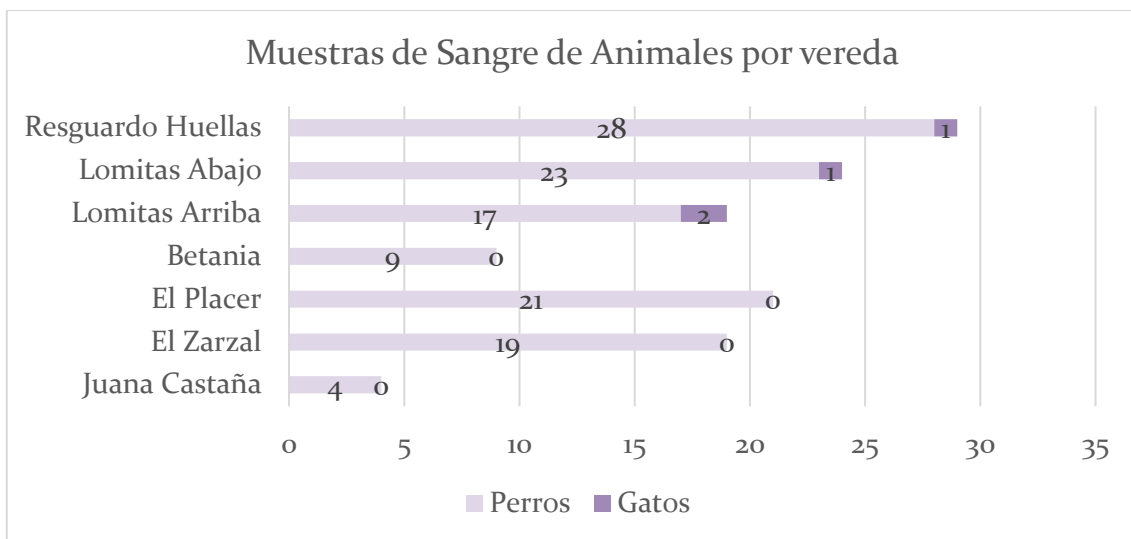


Figura 9. Distribución de muestras de sangre según animal y vereda de procedencia

6.2.2 Evaluación del ADN extraído de sangre

A las 125 muestras de sangre recolectadas de animales domésticos (perros y gatos), se les realizó la verificación de la calidad del ADN, usando el gen de la β -actina, todas las muestras analizadas fueron positivas para este gen, lo que nos indicó la calidad óptima para realizar las pruebas de detección molecular de genes rickettsiales. En la Figura 10 se observa la amplificación de gen β -actina en 13 muestras de sangre.



Figura 10. Productos amplificados para el gen β -actina en muestras de sangre con los iniciadores Actin-FWD y Actin-REV. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH), Carril 2-14 muestras de ADN de sangre (289 pb); Carril 15: Control negativo: Agua

6.2.3 Detección molecular de especies de Rickettsias en ADN extraído de sangre.

Se realizó un tamizaje para genes rickettsiales, analizando las 125 muestras de sangre, para el gen *gltA* en tiempo real utilizando los iniciadores CS-5 y CS-6 Tabla 2 (Labruna, Whitworth et al. 2004); el 19% (23/121) de perros fueron positivas para este gen, en las muestras de gatos no se amplificó ningún producto. Para la confirmación de estos resultados, se realizó PCR convencional para la amplificación de los genes *ompB* y *17KDa*. Las condiciones para la amplificación del gen *ompB* se encuentran en la Tabla 3, no se amplificó en ninguna de las muestras los genes *ompB* y *17KDa*.

6.3 Detección de especies de *Rickettsia* spp. en pulgas recolectadas sobre animales

Se recolectaron un total de 1283 pulgas sobre perros y gatos, el 96,6% (1240/1283) proveniente de 101 perros y el 3,4% (43/1283) recolectadas de 8 gatos. El 100% de las pulgas recolectadas fueron clasificada taxonómicamente en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad de la Salle Bogotá, como adultos de *C. felis*.

6.3.1 Evaluación del ADN extraído de pulga

A partir de las 1283 pulgas recolectadas se realizaron 244 pooles entre 1 y 5 especímenes, teniendo en cuenta la especie de pulga, el municipio de procedencia y la especie del animal que se encontraba parasitando en el momento de la captura. Se realizaron 245 pooles, 234 pooles de pulgas provenientes de perros y 11 pooles de gatos. La distribución de pooles por municipio se puede evidenciar en la Figura 11.

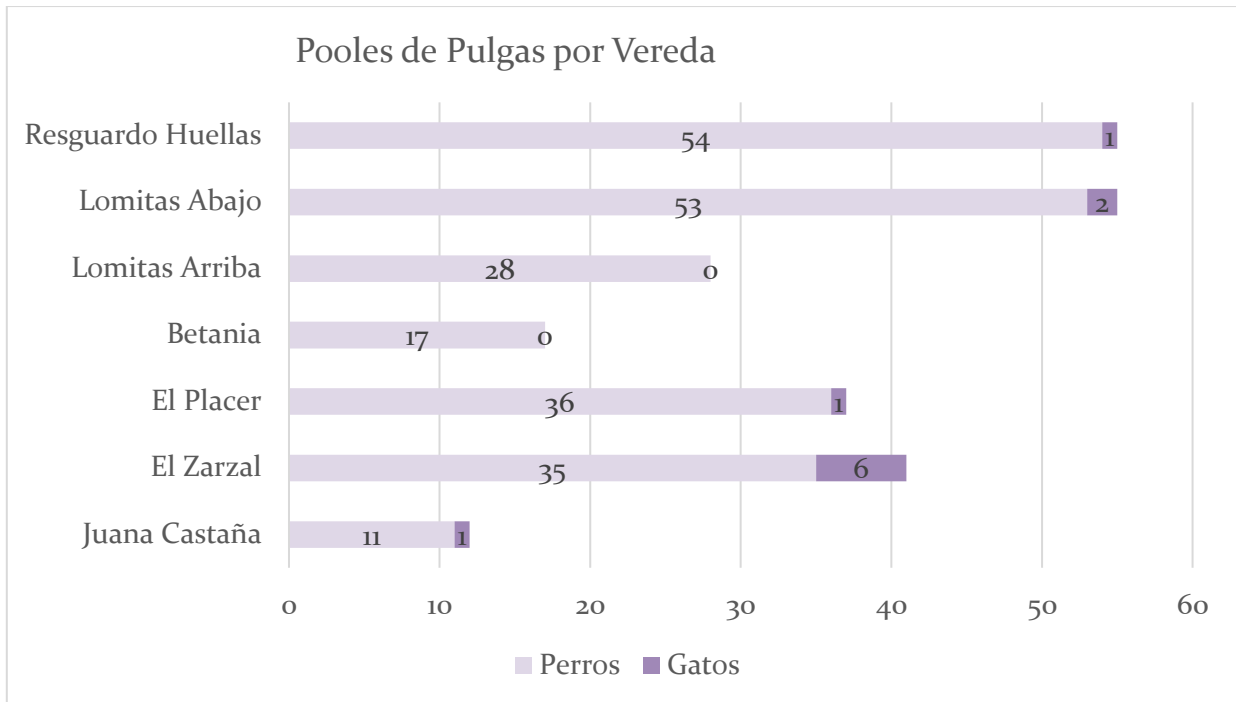


Figura 11. Distribución de pooles de pulgas, por vereda y especie de animal.

Los 245 pooles analizados, amplificaron correctamente el gen β -actina, los resultados se pueden visualizar en la Figura 12.

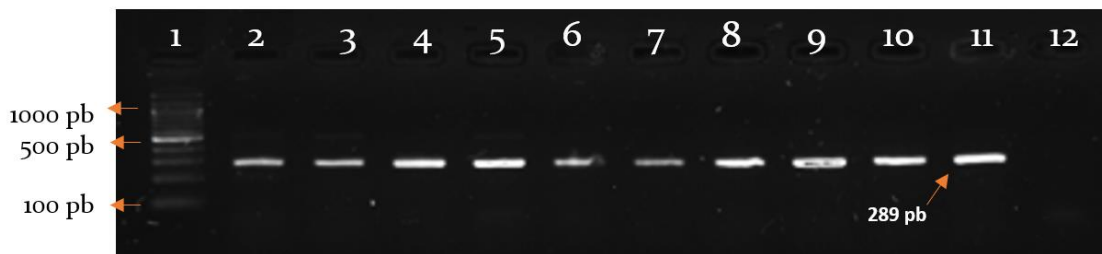


Figura 12. Productos amplificados para el gen β -actina en pooles de pulgas con los iniciadores Actin-FWD y Actin-REV. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH), Carril 2:-11 ADN de pooles de pulgas (289 pb); Carril 12: Control negativo: Agua

6.3.2 Detección de *Rickettsias* en pools de pulgas recolectadas sobre perros y gatos.

6.3.2.1 Tamizaje-Detección de gen *gltA* por PCR en tiempo real

Los 245 pools obtenidos (234 de pulgas provenientes de perros y 11 de gatos) fueron analizados en el tamizaje por PCR en tiempo real para la detección del gen rickettsial *gltA* (SYBR-Green) cuyas condiciones se observan en la Tabla 2. El 58,7% (144/245) de los pools fueron positivos para este gen, el 55% (135/245) de pools obtenidos de pulgas de perros y el 3,7% (9/245) de pools obtenidos de pulgas de gato. La distribución se puede observar en la Figura 13.

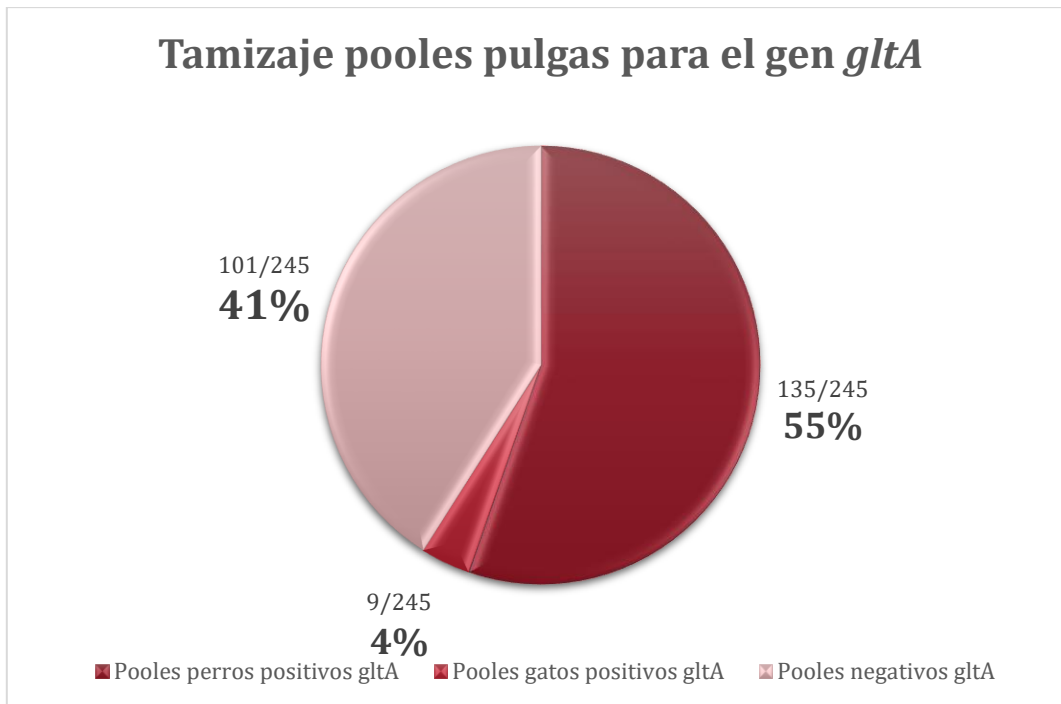


Figura 13. Diagrama pools de pulgas positivos en tamizaje para *gltA* en tiempo real

6.3.2.2 Detección de genes rickettsiales 17KDa y *ompB* por PCR convencional

Los pools positivos en el tamizaje para el gen *gltA* por PCR en tiempo real, fueron analizados para la detección de *ompB* y 17KDa por PCR convencional. Para 17KDa

se utilizaron los primers 17KD1 y 17KD2, condiciones descritas en la Tabla 3. El 100% (144/144) de las muestras analizadas para este gen fueron positivas. En la figura 14, se puede observar algunas muestras positivas para la amplificación del gen 17KDa y en la Figura 15 se presentan los resultados positivos para el gen 17KDa por vereda.

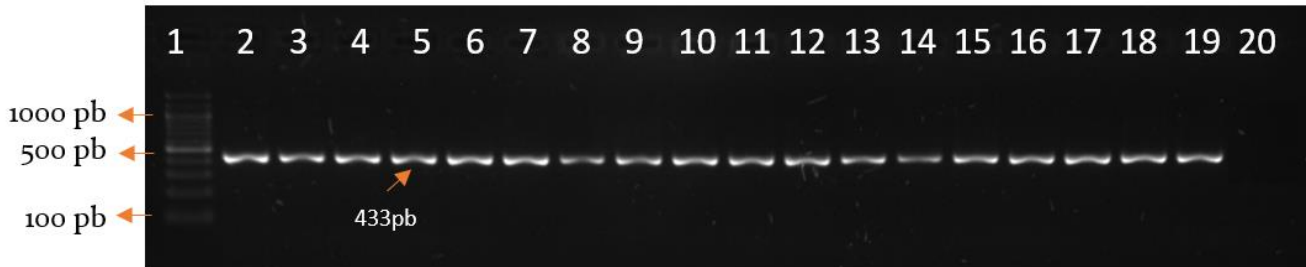


Figura 14. Productos amplificados para el gen 17KDa en pools de pulgas con los iniciadores 17KD1 y 17KD2; Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH), Carril 2-18 Pools de pulgas; Carril 19: Control positivo *Rickettsia slovaca* (433 pb); Carril 20: Control negativo: Agua

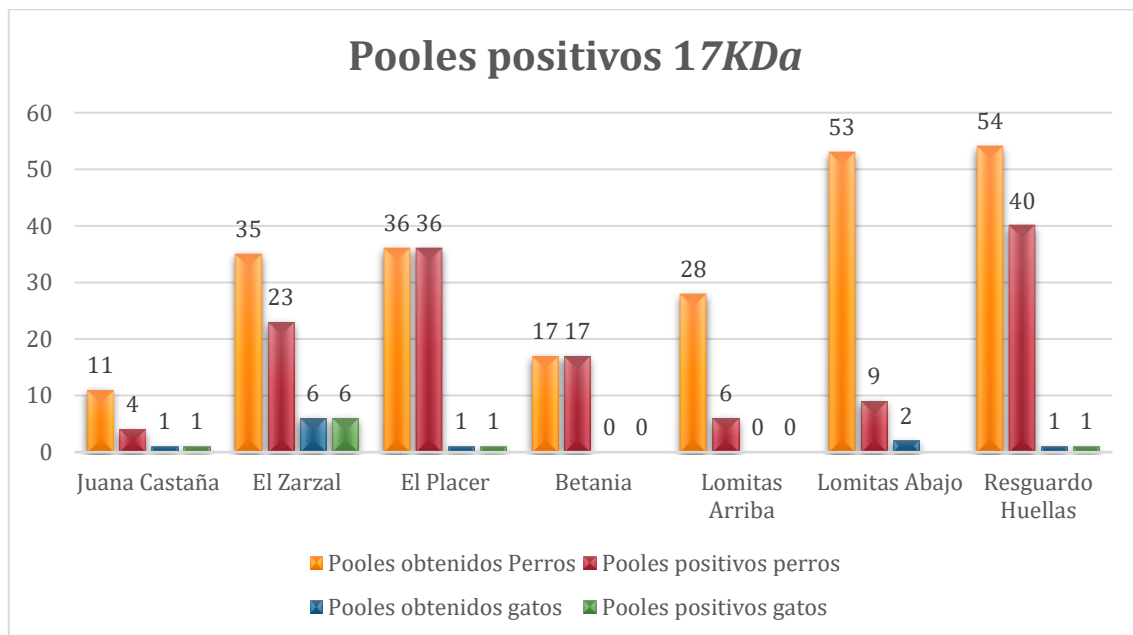


Figura 15. Distribución de resultados obtenidos para la amplificación del gen *gltA* y 17KDa en pools de pulga por vereda.

Todos los pools positivos para el gen *gltA*, fueron procesados por PCR convencional para el gen *ompB*, se utilizaron los iniciadores 120-2788 y 120-3599 descritos en la Tabla 3 y se obtuvo que el 96,5% (139/144) de las muestras analizadas son positivas para este gen. En la Figura 16 se observa el gel, con algunas muestras positivas para *ompB* y en la Figura 17, se describen los resultados positivos para este gen por vereda.

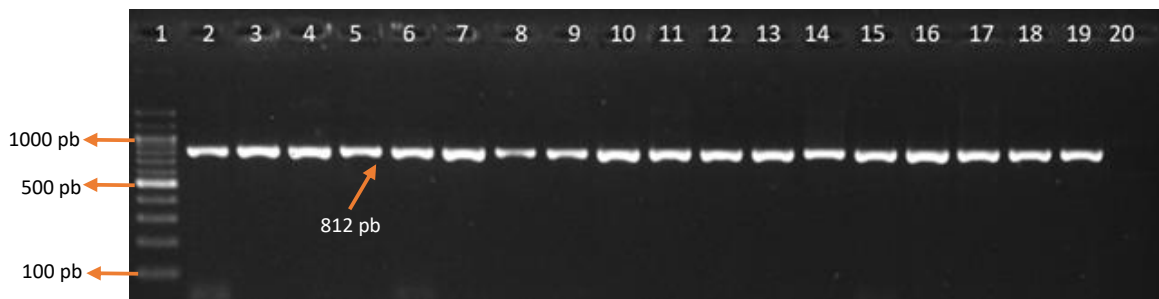


Figura 16. Productos amplificados para el gen *ompB* en muestras de sangre con los iniciadores 120-2788 y 120-3599. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH), Carril 2-18 muestras de pools de pulgas; Carril 19: Control positivo *Rickettsia slovaca* (812 pb); Carril 20: Control negativo: Agua

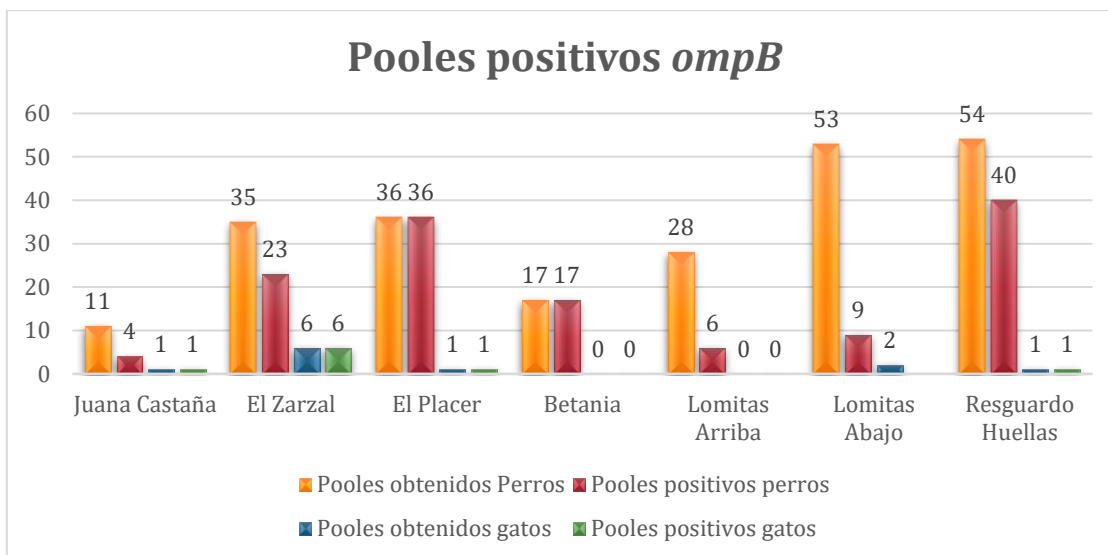


Figura 17. Distribución de resultados obtenidos para la amplificación del gen *ompB* en pools de pulga por vereda.

6.4 Identificación de especies de *Rickettsia* spp. por digestión de productos amplificados con endonucleasas.

6.4.1 Digestión de productos amplificados para el gen 17KDa con enzima *Xba*I

Con el fin de identificar las especies de *Rickettsia* spp. que se encontraban presentes en las pulgas recolectadas, se utilizó el protocolo descrito por Schriefer *et al.* 1994, realizando la digestión de los 144 pooles positivos para el gen 17KDa con la enzima de restricción *Xba*I, el 100% (144/144) de las muestras fueron identificadas como *R. felis* o RFLO. Se utilizó como control positivo del ensayo con endonucleasas, ADN de *R. typhi* y *R. felis*. En la figura 18, se observa, el gel de electroforesis donde fueron revelados los productos de la digestión.

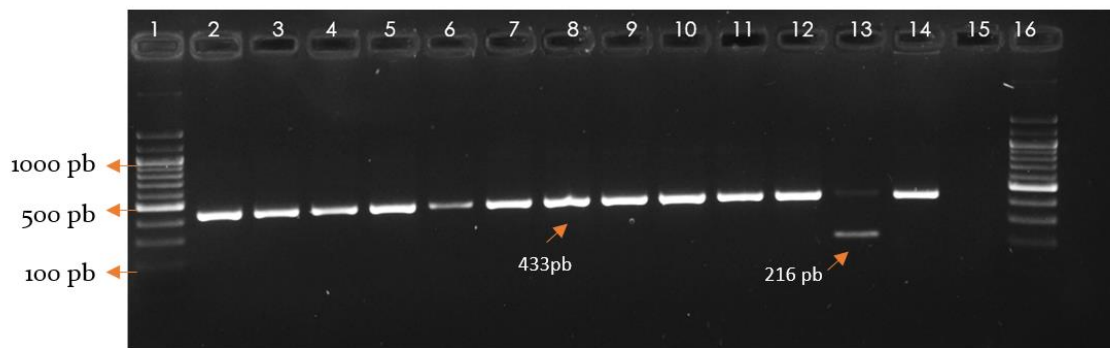


Figura 18. Patrones de restricción con *Xba*I para el gen 17-kD. Carril 1 y 16: Marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH); Carril 2-12: Patrón de restricción en 11 pooles de muestras, Carril 13: Patrón de restricción *R. typhi* (Corte 216 pb); Carril 14: Patrón de restricción *R. felis* (No genera corte en esta enzima); Carril 15: Control Negativo

6.4.2 Digestión de productos amplificados para el gen *ompB* con enzima *NlaIV*.

Se realizó la digestión de los 139 productos amplificados positivos para el gen *ompB*, obteniendo el 14,4% (20/139) positivo para *R. felis*, evidenciado en la ausencia de corte luego de la digestión, el 84,9% (118/139) positivo para *R. asembonensis*, evidenciado con la generación de un patrón de corte con dos bandas, una de 469 y otra de 301 pb y el 0,7% (1/139) positiva para *Candidatus R. senegalensis* con un patrón de corte de 661 y 109 pb. En la Figura 19, se evidencia un gel de electroforesis con los productos de digestión con *NlaIV*, para diferentes muestras.

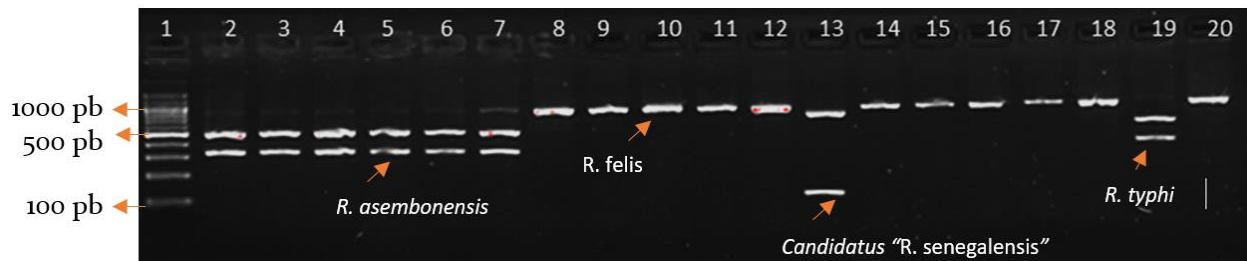


Figura 19. Patrones de restricción con *NlaIV* para el gen *ompB*. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (ZYMO RESEARCH); Carril 2-7: Patrón de restricción en pools de muestras positivas para *R. asembonensis*, Carril 8-12 y 14-18: Patrón de restricción en pools de muestras positivas para *R. felis*; Carril 13: Patrón de restricción en pool positivo para *Candidatus R. senegalensis*. Carril 19: Patrón de restricción para control positivo *R. typhi*; Carril 20: Patrón de restricción para control positivo *R. felis*.

6.5 Secuenciación de productos amplificados.

Se realizó la secuenciación del producto amplificado del gen *ompB* de un pool para cada patrón de restricción obtenido con la enzima *NlaIV*, las secuencias forward y reverse para cada muestra, fueron ensambladas, editadas y comparadas para la obtención de las secuencias consenso, estas últimas fueron comparadas por la

herramienta de Blastn del NCBI, comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank (Tabla 7), para confirmar la especie identificada previamente por PCR-RFLP.

Tabla 7. Resultados de alineamiento secuencias obtenidas para confirmación *R. felis*, *R. asembonensis* y *Ca. "Rickettsia senegalensis"*

Código Pool	Cepa alineada	Query cover	E value	% identidad	Número de acceso
P54_C38	<i>Rickettsia felis</i> clone Ar3 outer membrane protein B (ompB) gene, complete cds	99%	0.0	99,1,	GQ385243.1
	<i>Rickettsia asembonensis</i> isolate VGD7 ompB (ompB) gene, complete cds	100%	0.0	100%	KY650699.1
P127_C78	<i>Candidatus Rickettsia senegalensis</i> isolate Cf_US_0036D outer membrane protein B gene, partial cds	100%	0.0	99,73%	KT304219.1

La identificación del pool P127_C78 como *Candidatus Rickettsia senegalensis* es el primer reporte de esa especie en el país, por lo que se realizó la secuenciación del gen *gltA*. Las secuencias obtenidas para los genes *gltA*.y *ompB* fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los códigos de acceso: MK548198 y MK548198 (Anexos 3 y 4). Los árboles filogenéticos construidos para comprobar la identidad de la especie se observan en las figuras 20 y 21.

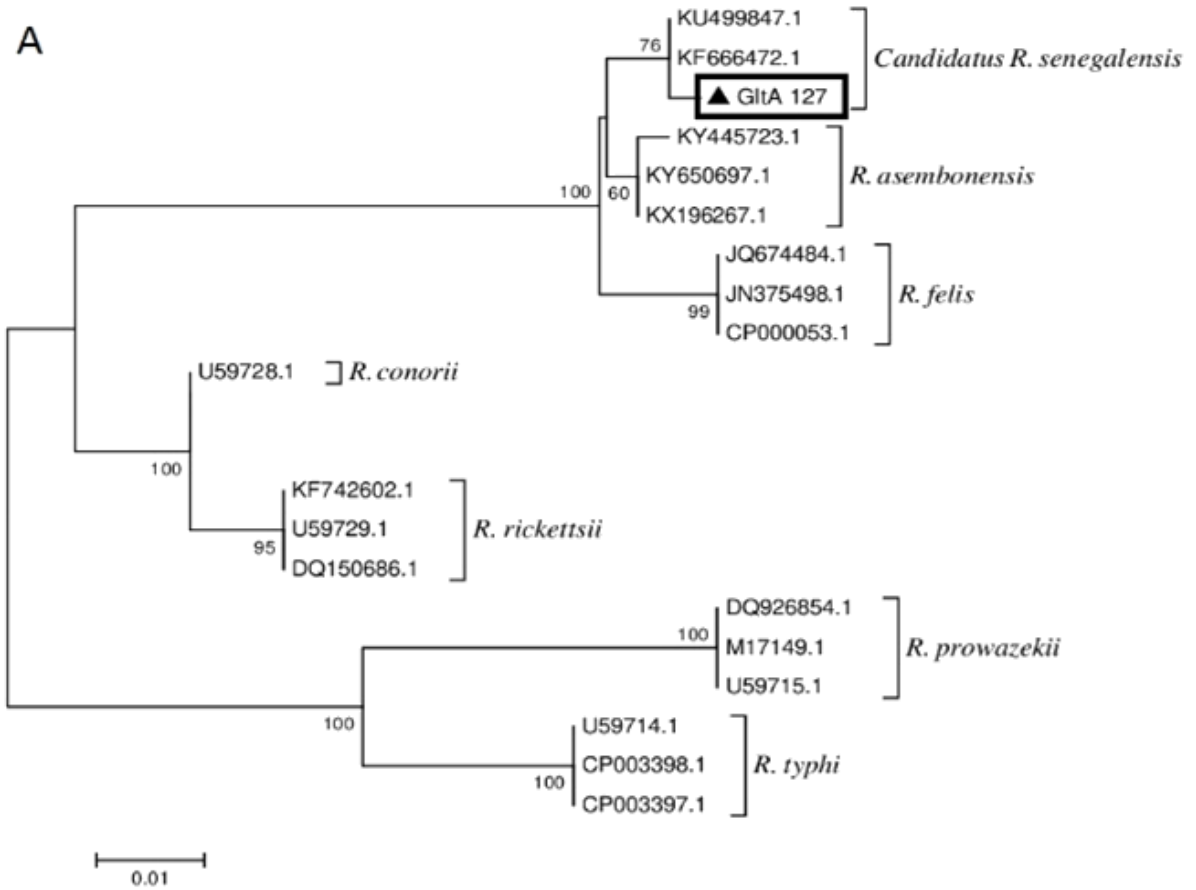


Figura 20. Árbol filogenético gen *gltA*, se confirmó la secuencia obtenida para *Candidatus R. senegalensis*, usando Kimura 2 parametros- Maximum Likelihood. La secuencia depositada en el GenBank está identificada con el número de acceso: MK548197

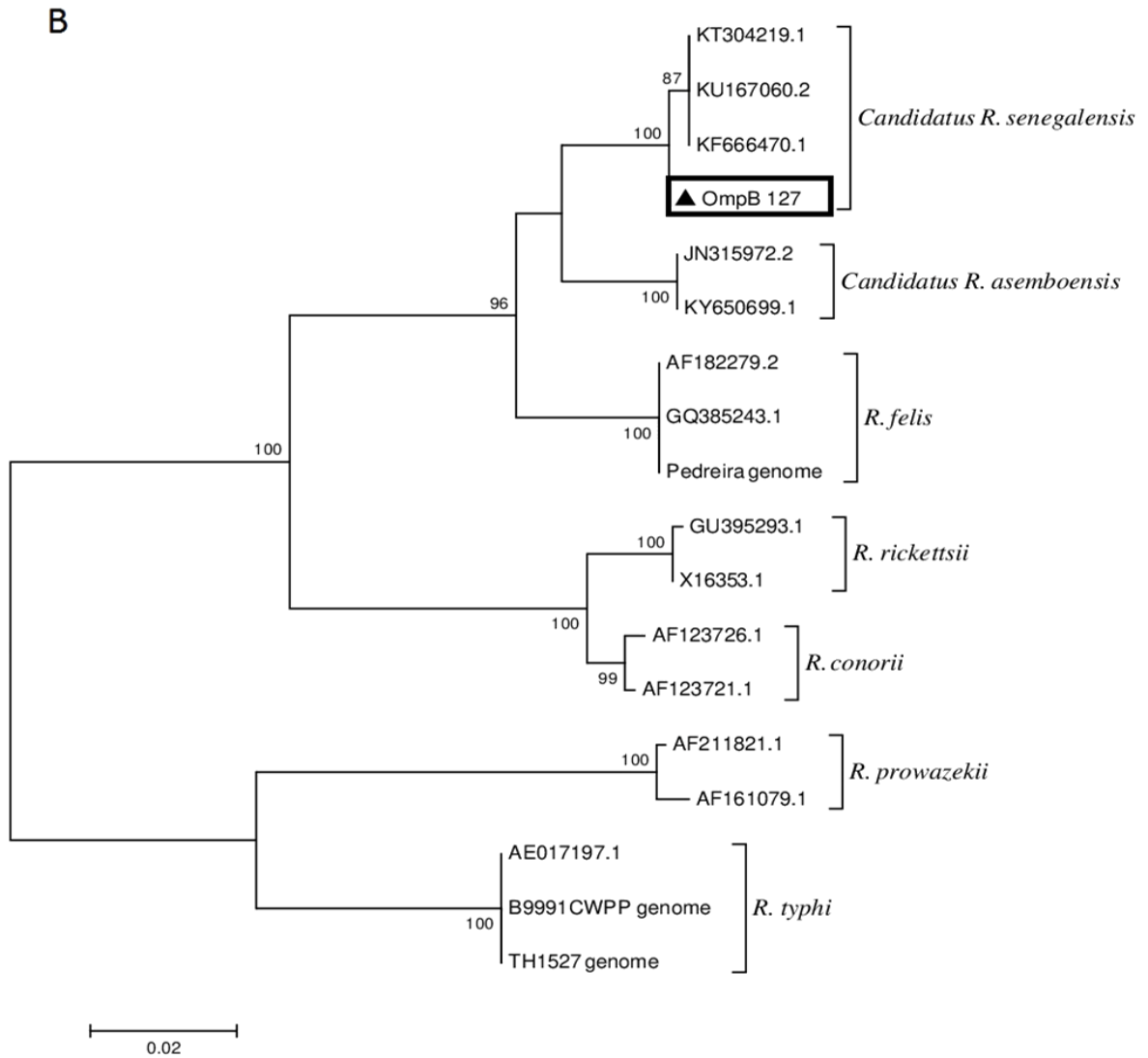


Figura 21. Árbol filogenético gen *ompB*. Se confirmó la secuencia obtenida para *Candidatus R. senegalensis*, usando Kimura 2 parametros- Maximum Likelihood. La secuencia depositada en el GenBank está identificada con el número de acceso: MK548198

7 DISCUSIÓN

En el departamento del Cauca, existe una seroprevalencia de rickettsiosis transmitidas por pulgas de 71,8%, lo que indica que la población habitante de las veredas La Sierra, El Placer, El Zarzal, Betania, Lomitas Arriba, Lomitas Abajo y Resguardo Huellas, ha tenido contacto con estas especies de *Rickettsia*. Hallazgos que se confirman con los resultados obtenidos en los pools de pulgas, donde el 58,7% de los pools es positivo para especies de *Rickettsia* spp. transmitidas por pulgas, identificando por primera vez en el departamento la presencia de *R. felis*, *R. asembonensis* y *Candidatus Rickettsia senegalensis*, estos resultados confirman una vez más que en nuestro país circulan diversas especies de *Rickettsia*, que se pueden encontrar asociadas a los síndromes febriles mal diagnosticados en nuestro país.

En el departamento de Caldas, se han reportado los más altos porcentajes de anticuerpos contra *R. typhi* y *R. felis*, encontrando una seroprevalencia del 71.8%: distribuida en 17,8% específica contra *R. felis*, 25,2% contra *R. typhi* y una reactividad cruzada del 28,7%, en los 7 municipios del departamento analizados (Hidalgo, Montoya et al. 2013), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio, evidenciando una seroprevalencia del general 74,4% contra rickettsias transmitidas por pulgas, distribuida en 14,4% contra *R. felis*, 30,4% *R. typhi* y una reactividad cruzada del 29,6%. Los resultados obtenidos en nuestro país, son altos comparados con los resultados de seroprevalencia, obtenidos en otras partes del mundo: 4,2% contra especies del grupo del Tifo en la India (Khan, Bora et al. 2016), 16% contra *R. felis* en China (Zhang, Lu et al. 2014). Los resultados obtenidos por Lim et al. 2016 en

Nueva Zelanda, demuestran la existencia de reactividad cruzada entre los anticuerpos producidos contra *R. typhi*, *R. felis* y otras Rickettsias pertenecientes al GFM; la seroprevalencia inicial obtenida en el estudio fue 10,7% en el tamizaje realizado en láminas antigenadas en el Laboratorio, posteriormente el uso de láminas comerciales que permitía diferenciar los anticuerpos producidos contra el GFM o GT, evidenció una seroprevalencia de 3,7% distribuida en 0,7% contra el TG, 0,9% GFM y 2,1% de reactividad cruzada, los análisis confirmatorios se realizaron por WesternBlot en el que se identificó que 64,8% (24/37) muestras analizadas presentaban reactividad cruzada (Lim, Weinstein et al. 2016). La alta seroprevalencia encontrada, puede encontrarse relacionada con la alta circulación de especies rickettsiales en el departamento y a la alta circulación de vectores artrópodos como pulgas en los animales domésticos.

Los resultados obtenidos demuestran, que la mayor parte de la población adulta de los municipios estudiados, ha tenido contacto previo con *R. felis* o *R. typhi*, lo que demuestra la circulación de agentes rickettsiales en el departamento del Cauca, y sugiere estudios que determinen si esta puede ser una causa de síndromes febriles no identificados de manera correcta en el departamento.

Para determinar la presencia de genes rickettsiales en sangres recolectadas de perros y gatos, se realizó utilizó la técnica de PCR, teniendo en cuenta la dificultad que existe para el aislamiento y cultivo de las especies del género *Rickettsia* spp. por métodos tradicionales (Walker 1996); en las 125 muestras de perros y 4 de gatos, no se logró la amplificación de dos o más genes rickettsiales, estos resultados pueden

interpretarse como un falso negativo, ya que estas especies al ser intracelulares obligadas y afectar las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, se encontrarían en bajo número de copias en el torrente sanguíneo (Williams, Sacchi et al. 1992), los resultados de este estudio, reportan una baja detección de genes rickettsiales en muestras de ADN de sangres de perros, lo que coincide con lo reportado en Bangkok donde solo lograron determinar la presencia de genes rickettsiales en el 4,24% (15/353) de las muestras de sangre de perros (Mongkol, Suputtamongkol et al. 2018), en Yucatán, se determinó la presencia de *R. typhi* en el 5,5% (7/128) de sangres de perros pertenecientes a una población con antecedentes de tifo murino en humanos (Blanton, Idowu et al. 2016), en Zambia, se identificó *R. felis* en el 4,7% (7/150) de los perros de Lusaka y Mazabuka (Moonga, Hayashida et al. 2019).

La mayor parte de los estudios alrededor del mundo, se han basado en identificar los agentes etiológicos, vectores asociados a transmisión, mamíferos hospederos y prevalencia en humanos, por lo que para determinar la circulación de agentes rickettsiales en los vectores, se recolectaron pulgas sobre perros y gatos domésticos pertenecientes a las mismas veredas; la detección molecular por técnicas de PCR de dos o más genes en las pulgas colectadas, permitió identificar que 58,7% (144/245) de los pools de pulgas *C. felis* obtenidos son positivos para *Rickettsia* spp., de los cuales el 14,4% fue identificado como *R. felis*; el 84,9% para *R. asembonensis*, y el 0,7% para *Candidatus R. senegalensis*, estos resultados evidencian la circulación de agentes rickettsiales en el departamento del Cauca, y constituyen el primer reporte de rickettsias transmitidas por pulgas para esta zona del país; estos resultados coinciden

con los obtenidos en el departamento de Caldas, donde se han reportado la presencia de *R. felis* en pulgas con tasas mínimas de 5,3% para *C. felis*, 9,2% para *C. canis*, y 10% para *P. irritans* (Ramírez-Hernández, Montoya et al. 2013), así como la presencia de *R. asemonensis* en pulgas colectadas sobre perros, gatos y roedores en el departamento de Caldas por nuestro grupo de investigación y cuyos resultados aún se encuentran en proceso de publicación. Nuestro grupo de investigación también determinó la presencia de *R. asemonensis* en pulgas *C. felis* obtenidas en el municipio de Villeta, Cundinamarca (Faccini-Martínez, Ramírez-Hernández et al. 2016).

En Latinoamérica, también se ha reportado la circulación de Rickettsias-RFLO, en pulgas provenientes de animales domésticos. En Ecuador 7/8 *C. felis* mostraron una identidad del 99,6-99,9% con “*Candidatus Rickettsia asemonensis*” (Oteo, Portillo et al. 2014). En Iquitos-Perú el 97,4% (185/190) de las pulgas *C. felis* recolectadas sobre mamíferos domésticos, fue positivo para “*Candidatus Rickettsia asemonensis*” (Kocher, Morrison et al. 2016). En Chile, se detectó la presencia de *R. felis* en el 70% de las pulgas *C. felis* recolectadas sobre gatos (Labruna, Ogrzewalska et al. 2007). Otro estudio realizado la Isla de Pascua en Chile, detectó la presencia de *R. asemonensis* y *Candidatus R. senegalensis* en pulgas *C. felis* recolectadas sobre perros (Cevitanes, Di Cataldo et al. 2018). En Brasil específicamente en el estado de Maranhão, el 78% de las pulgas identificadas como *C. felis* fue positiva para al menos dos genes rickettsiales, entre las especies identificadas se encontró *R. asemonensis* y *Candidatus R. senegalensis* (Silva, Vizzoni et al. 2017).

En Norteamérica también se ha reportado la presencia *R. felis* y organismos-RFLO; en México , el 20% de las pulgas correspondientes a *C. felis* fue positiva para *R. felis* (Peniche-Lara, Jimenez-Delgadillo et al. 2015). En Galveston, Texas se reportó la tasa mínima de infección en pulgas *C. felis*, contra: *R. felis* 1,3%, *R. typhi* 0,3%, *R. asembonensis* 0,3%, *Candidatus R. senegalensis* 2,0% (Blanton, Vohra et al. 2019). En el mundo se ha reportado la presencia de estas especies en India (Khan, Bora et al. 2016), Israel (Hornok, Baneth et al. 2018) y Senegal (Mediannikov, Aubadie-Ladrix et al. 2015). La amplia distribución de los agentes rickettsiales transmitidos por pulgas, pueden ser la causa de la alta seroprevalencia contra estas especies encontrada en esta región.

El uso de la enzima de restricción *NlaIV* sobre el producto amplificado para el gen *ompB*, permitió identificar las especies de *Rickettsia* spp. en los pools positivos, dichos resultados se confirmaron por secuenciación, realizando el alineamiento de la secuencia obtenida para cada patrón de restricción, la diferencia en los tamaños de los productos de restricción obtenidos, facilitaron la interpretación (Blanton, Quade et al. 2019).

C. felis fue la única especie de pulga capturada en el presente estudio, tanto en perros como en gatos, estos resultados coinciden con lo reportado en Australia, en donde esta especie es más común que *C. canis* (Chandra, Forsyth et al. 2017). Así como un estudio realizado en España, en el que se demostró, que en las especies de pulgas que infestan perros, *C. felis* es predominante con un 81,7%, comparado con *C. canis* 11,4% y *Pulex irritans* 6,9% (Gálvez, Montoya et al 2017).

La presencia de *C. felis* sobre perros y gatos demuestra que es un parásito multihospedero que puede servir como vector para Rickettsias, lo que representa un riesgo de exposición para la población humana debido al contacto cercano de los animales domésticos con la población (Parola 2011). Dicho contacto, se evidencia en los altos porcentajes de seroprevalencia encontrados en la región y sugieren medidas de prevención y control de pulgas, así como estudios que permitan dilucidar si estas especies son patógenas para el hombre, y puedan ser las causantes de síndromes febriles en esta región del país.

Estudios de densidad de pulgas, han reportado en Australia, que la presencia de *C. felis* de manera más abundante, encontrada en el 98,8% de la densidad total de pulgas colectada, se puede encontrar asociada a características climáticas y de vegetación (Slapeta, King et al. 2011). Adicionalmente estudios realizados sobre la preferencia de mamíferos por pulgas, han determinado que estos parásitos son multihospedero, y su presencia no está restringida a perros o gatos, por lo que se puede encontrar un alto número de *C. felis* sobre perros domésticos (Clark, Seddon et al. 2018).

8 CONCLUSIONES

- Se determinó la seroprevalencia de rickettsiosis transmitidas por pulgas, en la población analizada.
- No se detectaron genes rickettsiales en las muestras de sangre de perros y gatos recolectadas
- El análisis de los vectores mediante PCR-RFLP, demostró la alta circulación especies de *R. felis* o *R. felis*-like en los cuatro municipios incluidos en el estudio.
- El presente estudio constituye el primer informe de *Candidatus Rickettsia senegalensis* en *C. felis* de perros en Colombia.

9 RECOMENDACIONES

- Se deben realizar nuevos estudios de investigación en el departamento del Cauca, que involucren la captura de roedores y permitan dilucidar el papel de estos animales en la transmisión de rickettsias transmitidas por pulgas
- Se deben iniciar acciones que permitan establecer a las rickettsiosis como enfermedades de notificación obligatorio en el sistema nacional de vigilancia SIVIGILA.

10 BIBLIOGRAFIA

Adams, J. R., E. T. Schmidtman and A. F. Azad (1990). "Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouché), with a rickettsia-like microorganism." Am J Trop Med Hyg **43**(4): 400-409.

Azad, A. F., S. Radulovic, J. A. Higgins, B. H. Noden and J. M. Troyer (1997). "Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations." Emerg Infect Dis **3**(3): 319-327.

Badiaga, S., S. Benkouiten, H. Hajji, D. Raoult and P. Brouqui (2012). "Murine typhus in the homeless." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **35**(1): 39-43.

Balleydier, E., G. Camuset, C. Socolovschi, M. P. Moiton, B. Kuli, A. Foucher, P. Poubeau, G. Borgherini, G. Wartel, H. Audin, D. Raoult, L. Filleul, P. Parola and F. Pagès (2015). "Murine typhus, Reunion, France, 2011-2013." Emerg Infect Dis **21**(2): 316-319.

Basra, G., M. A. Berman and L. S. Blanton (2012). "Murine typhus: an important consideration for the nonspecific febrile illness." Case Rep Med **2012**: 134601.

Bechah, Y., C. Capo, J. L. Mege and D. Raoult (2008). "Epidemic typhus." Lancet Infect Dis **8**(7): 417-426.

Bernabeu-Wittel, M., M. D. del Toro, M. M. Nogueras, M. A. Muniain, N. Cardeñosa, F. J. Márquez, F. Segura and J. Pachón (2006). "Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **25**(6): 375-381.

Billeter, S. A., P. P. Diniz, L. A. Jett, A. L. Wournell, A. M. Kjemtrup, K. A. Padgett, M. H. Yoshimizu, M. E. Metzger and M. C. Barr (2016). "Detection of Rickettsia Species in Fleas Collected from Cats in Regions Endemic and Nonendemic for Flea-Borne Rickettsioses in California." Vector Borne Zoonotic Dis **16**(3): 151-156.

Bitam, I., K. Dittmar, P. Parola, M. F. Whiting and D. Raoult (2010). "Fleas and flea-borne diseases." Int J Infect Dis **14**(8): e667-676.

Blanton, L. S., B. M. Idowu, T. N. Tatsch, J. M. Henderson, D. H. Bouyer and D. H. Walker (2016). "Opossums and Cat Fleas: New Insights in the Ecology of Murine Typhus in Galveston, Texas." Am J Trop Med Hyg **95**(2): 457-461.

Blanton, L. S., B. R. Quade and D. H. Bouyer (2019). "Differentiation of *Rickettsia felis* and Rickettsia felis-Like Organisms via Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis." Vector Borne Zoonotic Diseases.

Blanton, L. S., R. F. Vohra, L. Fistein, B. Quade, D. H. Walker and D. H. Bouyer (2019). "Rickettsiae Within the Fleas of Feral Cats in Galveston, Texas." Vector Borne Zoonotic Dis.

Blanton, L. S. and D. H. Walker (2017). "Flea-Borne Rickettsioses and Rickettsiae." Am J Trop Med Hyg **96**(1): 53-56.

Boostrom, A., M. S. Beier, J. A. Macaluso, K. R. Macaluso, D. Sprenger, J. Hayes, S. Radulovic and A. F. Azad (2002). "Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas." Emerg Infect Dis **8**(6): 549-554.

Brown, L. D., R. C. Christofferson, K. H. Banajee, F. Del Piero, L. D. Foil and K. R. Macaluso (2015). "Cofeeding intra- and interspecific transmission of an emerging insect-borne rickettsial pathogen." Mol Ecol **24**(21): 5475-5489.

Brown, L. D. and K. R. Macaluso (2016). "*Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis." Curr Trop Med Rep **3**: 27-39.

Capelli, G., F. Montarsi, E. Porcellato, G. Maioli, C. Furnari, L. Rinaldi, G. Oliva and D. Otranto (2009). "Occurrence of *Rickettsia felis* in dog and cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from Italy." Parasit Vectors **2 Suppl 1**: S8.

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

Cevitanes, A., S. Di Cataldo, F. Vera, P. Lillo and J. Millán (2018). "Molecular Detection of Vector-Borne Pathogens in Rural Dogs and Associated *Ctenocephalides felis* Fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Easter Island (Chile)." J Med Entomol **55**(6): 1659-1663.

Chandra, S., M. Forsyth, A. L. Lawrence, D. Emery and J. Šlapeta (2017). "Cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from cats and dogs in New Zealand: Molecular characterisation, presence of *Rickettsia felis* and *Bartonella clarridgeiae* and comparison with Australia." Vet Parasitol **234**: 25-30.

Clark, N. J., J. M. Seddon, J. Šlapeta and K. Wells (2018). "Parasite spread at the domestic animal - wildlife interface: anthropogenic habitat use, phylogeny and body mass drive risk of cat and dog flea (*Ctenocephalides* spp.) infestation in wild mammals." Parasit Vectors **11**(1): 8.

Cowdry, E. V. (1923). "the distribution of rickettsia in the tissues of insects and arachnids." Journal of Experimental Medicine **37**: 431-456.

Daniel, S. A., K. Manika, M. Arvanmdou and A. Antoniadis (2002). "Prevalence of *Rickettsia conorii* and *Rickettsia typhi* infections in the population of northern Greece." Am J Trop Med Hyg **66**(1): 76-79.

du Breuil, R. M., J. M. Patel and B. V. Mendelow (1993). "Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR." PCR Methods Appl **3**(1): 57-59.

Durden, L. A. and N. C. Hinkle (2019). Fleas (Siphonaptera). Medical and Veterinary Entomology. G. R. Mullen and L. A. Durden: 145-169.

Emilio, W. (1988). Biology of Rickettsial Diseases.

Faccini-Martínez, Á., A. Ramírez-Hernández, E. Forero-Becerra, J. A. Cortés-Vecino, P. Escandón, J. D. Rodas, A. M. Palomar, A. Portillo, J. A. Oteo and M. Hidalgo (2016). "Molecular Evidence of Different Rickettsia Species in Villeta, Colombia." Vector Borne Zoonotic Dis **16**(2): 85-87.

Fang, R., L. S. Blanton and D. H. Walker (2017). "Rickettsiae as Emerging Infectious Agents." Clin Lab Med **37**(2): 383-400.

Federhen, S. (2012). "The NCBI Taxonomy database." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D136-143.

Forshey, B. M., A. Stewart, A. C. Morrison, H. Gálvez, C. Rocha, H. Astete, D. Eza, H. W. Chen, C. C. Chao, J. M. Montgomery, D. E. Bentzel, W. M. Ching and T. J. Kochel (2010). "Epidemiology of spotted fever group and typhus group rickettsial infection in the Amazon basin of Peru." Am J Trop Med Hyg **82**(4): 683-690.

Fuxelius, H. H., A. Darby, C. K. Min, N. H. Cho and S. G. Andersson (2007). "The genomic and metabolic diversity of Rickettsia." Res Microbiol **158**(10): 745-753.

Gillespie, J. J., N. C. Ammerman, M. Beier-Sexton, B. S. Sobral and A. F. Azad (2009). "Louse- and flea-borne rickettsioses: biological and genomic analyses." Vet Res **40**(2): 12.

Gillespie, J. J., S. J. Kaur, M. S. Rahman, K. Rennoll-Bankert, K. T. Sears, M. Beier-Sexton and A. F. Azad (2015). "Secretome of obligate intracellular Rickettsia." FEMS Microbiol Rev **39**(1): 47-80.

Gillespie, J. J., K. Williams, M. Shukla, E. E. Snyder, E. K. Nordberg, S. M. Ceraul, C. Dharmanolla, D. Rainey, J. Soneja, J. M. Shallom, N. D. Vishnubhat, R. Wattam, A. Purkayastha, M. Czar, O. Crasta, J. C. Setubal, A. F. Azad and B. S. Sobral (2008). "Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life." PLoS One **3**(4): e2018.

Gross, L. (1996). "How Charles Nicolle of the Pasteur Institute discovered that epidemic typhus is transmitted by lice: reminiscences from my years at the Pasteur Institute in Paris." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10539-10540.

Gálvez, R., A. Montoya, R. Checa, O. Martín, V. Marino and G. Miró (2017). "Flea species infesting dogs in Spain: updated spatial and seasonal distribution patterns." Med Vet Entomol **31**(1): 107-113.

Haglund, C. M., J. E. Choe, C. T. Skau, D. R. Kovar and M. D. Welch (2010). "*Rickettsia* Sca2 is a bacterial formin-like mediator of actin-based motility." Nat Cell Biol **12**(11): 1057-1063.

Hidalgo, M., V. Montoya, A. Martínez, M. Mercado, A. De la Ossa, C. Vélez, G. Estrada, J. E. Pérez, A. A. Faccini-Martínez, M. B. Labruna and G. Valbuena (2013). "Flea-borne rickettsioses in the north of Caldas province, Colombia." Vector Borne Zoonotic Dis **13**(5): 289-294.

Hidalgo, M., E. Salguero, A. de la Ossa, R. Sánchez, J. F. Vesga, L. Orejuela and G. Valbuena (2008). "Murine typhus in Caldas, Colombia." Am J Trop Med Hyg **78**(2): 321-322.

Hornok, S., G. Baneth, A. Grima, N. Takács, J. Kontschán, M. L. Meli, V. Suter, H. Salant, R. Farkas and R. Hofmann-Lehmann (2018). "Molecular investigations of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) provide the first evidence of *Rickettsia felis* in Malta and *Candidatus Rickettsia senegalensis* in Israel." New Microbes New Infect **25**: 3-6.

Jiang, J., A. N. Maina, D. L. Knobel, S. Cleaveland, A. Laudisoit, K. Wamburu, E. Ogola, P. Parola, R. F. Breiman, M. K. Njenga and A. L. Richards (2013). "Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia asembaensis* in fleas from human habitats, Asembo, Kenya." Vector Borne Zoonotic Dis **13**(8): 550-558.

Khan, S. A., T. Bora, S. Chattopadhyay, J. Jiang, A. L. Richards and P. Dutta (2016). "Seroepidemiology of rickettsial infections in Northeast India." Trans R Soc Trop Med Hyg **110**(8): 487-494.

Kocher, C., A. C. Morrison, M. Leguia, S. Loyola, R. M. Castillo, H. A. Galvez, H. Astete, C. Flores-Mendoza, J. S. Ampuero, D. G. Bausch, E. S. Halsey, M. Cespedes, K. Zevallos, J. Jiang and A. L. Richards (2016). "Rickettsial Disease in the Peruvian Amazon Basin." PLoS Negl Trop Dis **10**(7): e0004843.

La Scola, B., L. Rydkina, J. B. Ndiokubwayo, S. Vene and D. Raoult (2000). "Serological differentiation of murine typhus and epidemic typhus using cross-adsorption and Western blotting." Clin Diagn Lab Immunol **7**(4): 612-616.

Labruna, M. B., M. Ogrzewalska, J. Moraes-Filho, P. Lepe, J. L. Gallegos and J. López (2007). "*Rickettsia felis* in Chile." Emerg Infect Dis **13**(11): 1794-1795.

Labruna, M. B. and D. H. Walker (2014). "*Rickettsia felis* and changing paradigms about pathogenic rickettsiae." Emerg Infect Dis **20**(10): 1768-1769.

Labruna, M. B., T. Whitworth, M. C. Horta, D. H. Bouyer, J. W. McBride, A. Pinter, V. Popov, S. M. Gennari and D. H. Walker (2004). "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 **42**(1): 90-98.

Lewis, R. E. (1993). Fleas (Siphonaptera). Medical Insects and Arachnids. C. R. W. Lane R.P., Springer, Dordrecht.

Lim, M. Y., P. Weinstein, A. Bell, T. Hambling, D. M. Tompkins and D. Slaney (2016). "Seroprevalence of antibodies to *Rickettsia typhi* in the Waikato region of New Zealand." Epidemiol Infect **144**(11): 2283-2289.

Linardi, P. M. and J. L. Santos (2012). "*Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species." Rev Bras Parasitol Vet **21**(4): 345-354.

Luce-Fedrow, A., A. N. Maina, E. Otiang, F. Ade, S. Omulo, E. Ogola, L. Ochieng, M. K. Njenga and A. L. Richards (2015). "Isolation of *Candidatus* Rickettsia asemboensis from *Ctenocephalides* Fleas." Vector Borne Zoonotic Dis **15**(4): 268-277.

Maina, A. N., A. Luce-Fedrow, S. Omulo, J. Hang, T. C. Chan, F. Ade, D. D. Jima, E. Ogola, H. Ge, R. F. Breiman, M. K. Njenga and A. L. Richards (2016). "Isolation and characterization of a novel Rickettsia species (*Rickettsia asembonensis* sp. nov.) obtained from cat fleas (*Ctenocephalides felis*)." Int J Syst Evol Microbiol **66**(11): 4512-4517.

Mansueto, P., G. Vitale, A. Cascio, A. Seidita, I. Pepe, A. Carroccio, S. di Rosa, G. B. Rini, E. Cillari and D. H. Walker (2012). "New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases." Clin Dev Immunol **2012**: 967852.

Mediannikov, O., M. Aubadie-Ladrix and D. Raoult (2015). "*Candidatus* 'Rickettsia senegalensis' in cat fleas in Senegal." New Microbes New Infect **3**: 24-28.

Merhej, V., E. Angelakis, C. Socolovschi and D. Raoult (2014). "Genotyping, evolution and epidemiological findings of Rickettsia species." Infect Genet Evol **25**: 122-137.

Merhej, V., K. Georgiades and D. Raoult (2013). "Postgenomic analysis of bacterial pathogens repertoire reveals genome reduction rather than virulence factors." Brief Funct Genomics **12**(4): 291-304.

Mongkol, N., Y. Suputtamongkol, P. Taweethavonsawat and S. Foongladda (2018). "Molecular Evidence of *Rickettsia* in Human and Dog Blood in Bangkok." Vector Borne Zoonotic Dis **18**(6): 297-302.

Moonga, L. C., K. Hayashida, R. Nakao, M. Lisulo, C. Kaneko, I. Nakamura, Y. Eshita, A. S. Mweene, B. Namangala, C. Sugimoto and J. Yamagishi (2019). "Molecular detection of *Rickettsia felis* in dogs, rodents and cat fleas in Zambia." Parasit Vectors **12**(1): 168.

Mooser, H. (1928). "Experiments Relating to the Pathology and the Etiology of Mexican Typhus (Tabardillo)." The Journal of Infectious Diseases **43**: 261-272.

Mumcuoglu, Y. and T. Ruffli (1979). "[Siphonaptera/fleas (author's transl)]." Schweiz Rundsch Med Prax **68**(37): 1172-1182.

Noden, B. H., S. Davidson, J. L. Smith and F. Williams (2017). "First Detection of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in Fleas Collected From Client-Owned Companion Animals in the Southern Great Plains." J Med Entomol **54**(4): 1093-1097.

Noden, B. H., S. Radulovic, J. A. Higgins and A. F. Azad (1998). "Molecular identification of *Rickettsia typhi* and *R. felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae)." J Med Entomol **35**(4): 410-414.

Ogata, H., P. Renesto, S. Audic, C. Robert, G. Blanc, P. E. Fournier, H. Parinello, J. M. Claverie and D. Raoult (2005). "The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite." PLoS Biol **3**(8): e248.

Olano, J. P. (2005). "Rickettsial infections." Ann N Y Acad Sci **1063**: 187-196.

Oteo, J. A., A. Portillo, F. Portero, J. Zavala-Castro, J. M. Venzal and M. B. Labruna (2014). "'*Candidatus Rickettsia asemboensis*' and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador." Parasit Vectors **7**: 455.

Parola, P. (2007). Rickettsial Diseases.

Parola, P. (2011). "Rickettsia felis: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa." Clin Microbiol Infect **17**(7): 996-1000.

Parola, P., C. D. Paddock, C. Socolovschi, M. B. Labruna, O. Mediannikov, T. Kernif, M. Y. Abdad, J. Stenos, I. Bitam, P. E. Fournier and D. Raoult (2013). "Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach." Clin Microbiol Rev **26**(4): 657-702.

Parola, P., O. Y. Sanogo, K. Lerdthusnee, Z. Zeaiter, G. Chauvancy, J. P. Gonzalez, R. S. Miller, S. R. Telford, C. Wongsrichanalai and D. Raoult (2003). "Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in ffrom the Thai-Myanmar border." Ann N Y Acad Sci **990**: 173-181.

Peniche-Lara, G., B. Jimenez-Delgadillo and K. Dzul-Rosado (2015). "*Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia felis* infection in *Rhipicephalus sanguineus* ticks and *Ctenocephalides felis* fleas co-existing in a small city in Yucatan, Mexico." J Vector Ecol **40**(2): 422-424.

Philippe, P. (2007). Rickettsial Diseases.

Ramírez-Hernández, A., V. Montoya, A. Martínez, J. E. Pérez, M. Mercado, A. de la Ossa, C. Vélez, G. Estrada, M. I. Correa, L. Duque, J. S. Ariza, C. Henao, G. Valbuena and M. Hidalgo (2013). "Molecular detection of *Rickettsia felis* in different flea species from Caldas, Colombia." Am J Trop Med Hyg **89**(3): 453-459.

Raoult, D., V. Roux, J. B. Ndiokubwayo, G. Bise, D. Baudon, G. Marte and R. Birtles (1997). "Jail fever (epidemic typhus) outbreak in Burundi." Emerg Infect Dis **3**(3): 357-360.

Riley, S. P., K. C. Goh, T. M. Hermanas, M. M. Cardwell, Y. G. Chan and J. J. Martinez (2010). "The *Rickettsia conorii* autotransporter protein Sca1 promotes adherence to nonphagocytic mammalian cells." Infect Immun **78**(5): 1895-1904.

Roux, V. and D. Raoult (2000). "Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB)." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 4**: 1449-1455.

Schriefer, M. E., J. B. Sacci, J. P. Taylor, J. A. Higgins and A. F. Azad (1994). "Murine typhus: updated roles of multiple urban components and a second typhuslike rickettsia." J Med Entomol **31**(5): 681-685.

Sekeyova, Z., V. Roux and D. Raoult (2001). "Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 4): 1353-1360.

Silva, A. B., V. F. Vizzoni, A. P. Costa, F. B. Costa, J. Moraes-Filho, M. B. Labruna, G. S. Gazêta and R. de Maria Seabra Nogueira (2017). "First report of a *Rickettsia asembonensis* related infecting fleas in Brazil." Acta Trop **172**: 44-49.

Slapeta, J., J. King, D. McDonnell, R. Malik, D. Homer, P. Hannan and D. Emery (2011). "The cat flea (*Ctenocephalides f. felis*) is the dominant flea on domestic dogs and cats in Australian veterinary practices." Vet Parasitol **180**(3-4): 383-388.

Uchiyama, T. (2012). "Tropism and pathogenicity of rickettsiae." Front Microbiol **3**: 230.

Walker, D. H. (1996). Chapter 38. Rickettsiae. Medical Microbiology, 4th edition. S. Baron. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

Walker, D. H. (2004). "Ricketts creates rickettsiology, the study of vector-borne obligately intracellular bacteria." J Infect Dis **189**(5): 938-955.

Williams, S. G., J. B. Sacci, M. E. Schriefer, E. M. Andersen, K. K. Fujioka, F. J. Sorvillo, A. R. Barr and A. F. Azad (1992). "Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California." J Clin Microbiol **30**(7): 1758-1762.

Wilson, L. B. and W. M. Chowning (1979). "Classics in infectious diseases. Reprinted from The Journal of Infectious Diseases 1:31-57, 1904. Studies in Pyroplasmosis Hominis ("Spotted Fever" or "Tick Fever" of the Rocky Mountains)." Rev Infect Dis **1**(3): 540-558.

Wolbach, S. B. (1919). "Studies on Rocky Mountain spotted Fever." J Med Res **41**(1): 1-198.141.

Yu, X.-J. and D. Walker (2006). "The order Rickettsiales." Prokaryotes **5**: 493-528.

Zhang, J., G. Lu, P. Kelly, Z. Zhang, L. Wei, D. Yu, S. Kayizha and C. Wang (2014). "First report of *Rickettsia felis* in China." BMC Infect Dis **14**: 682.

Znazen, A. and D. Raoult (2007). Flea-borne spotted fever. Rickettsial Diseases. R. Didier and P. Philippe. New York: 87-96.

11 ANEXOS

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 3125187966 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 estudiados inmediatamente o guardados 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

 Gobernación del Cauca Secretaría de Salud		 Pontificia Universidad JAVERIANA		 UNIVERSIDAD DE LASALLE	
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 salpuldido o ronchas en su cuerpo? S/N _____					
En qué partes del cuerpo?: _____					
Ha sido diagnosticado con Dengue, Sika, Chinkungunya, 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 zarigüellas?: 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

Número de acceso GenBank "P127": MK548197.1

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK548197>)

Candidatus Rickettsia senegalensis isolate P127 citrate synthase (gltA) gene, partial cds

GenBank: MK548197.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

```
LOCUS       MK548197                483 bp    DNA     linear   BCT 26-MAY-2019
DEFINITION  Candidatus Rickettsia senegalensis isolate P127 citrate synthase
            (gltA) gene, partial cds.
ACCESSION   MK548197
VERSION     MK548197.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Candidatus Rickettsia senegalensis
  ORGANISM  Candidatus Rickettsia senegalensis
            Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales;
            Rickettsiaceae; Rickettsieae; Rickettsia; spotted fever group.
REFERENCE   1 (bases 1 to 483)
  AUTHORS   Betancourt,P., Martinez,H., Gil,J., Ospina,C., Olaya,I.A.,
            Benavides,E., Bolanos,E., Cuervo,C., Blanton,I. and Hidalgo,M.
  TITLE     First report of Candidatus 'Rickettsia senegalensis' in fleas
            (Ctenocephalides felis) collected in domestic animals from Cauca,
            Colombia
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 483)
  AUTHORS   Betancourt,P., Hidalgo,M. and Cuervo,C.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (28-FEB-2019) Microbiologia, Pontificia Universidad
            Javeriana, Cra 7 43-82 Ed 53 Lab 401, Bogota, Bogota 110231,
            Colombia
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..483
                     /organise="Candidatus Rickettsia senegalensis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="P127"
                     /host="Ctenocephalides felis (flea)"
                     /db_xref="taxon:1436799"
                     /country="Colombia: Santander de Quilichao, Cauca"
                     /collection_date="2017"
     gene             1..483
                     /gene="gltA"
     CDS              1..483
                     /gene="gltA"
                     /codon_start=2
                     /translation="ASIGEDVIDISRVSSEADCFYDQPGMSTASCQSTITYINGDKG
            ILRHRQYDIKDLAEKSDFLVAYLLIYGELPSIEQYMNFTKQVAHSLVNERLHLYLFQ
            TFCSSHPMAIMLAANGSLSAFYDOLLNFKEA"
ORIGIN
1  tgcaagtatc  ggtgaggatg  taattgatat  aagcagggta  tcttcggaag  cggattgttt
61  tacttatgat  cggggcttta  tgctactatg  ttctgtcag  tctactatca  cttatataaa
121  cggtgataaa  ggaatcttgc  gacatcgagg  atatgacatt  aaagatttag  cggagaaaaa
181  tgatttttta  gaattggcat  atttgcatt  ctatggagaa  ttaccaagca  tcgagcagta
241  taataatttc  actaacagg  ttgctcatca  ttcatttagt  aatgaaagat  tacactatft
301  atttcaaac  tttttagact  ctctcatccc  tatggctatt  atgcttgggg  cegttaggtc
361  tctttcagca  ttttatcctg  atttattgaa  ttttaaggaa  gca
//
```

Anexo 4

Número de acceso GenBank "P127": MK548198.1

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK548198>)

Candidatus Rickettsia senegalensis isolate P127 outer membrane protein B (ompB) gene, partial cds

GenBank: MK548198.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS MK548198 742 bp DNA linear BCT 26-MAY-2019

DEFINITION Candidatus Rickettsia senegalensis isolate P127 outer membrane protein B (ompB) gene, partial cds.

ACCESSION MK548198

VERSION MK548198.1

KEYWORDS .

SOURCE Candidatus Rickettsia senegalensis

ORGANISM [Candidatus Rickettsia senegalensis](#)

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; Rickettsieae; Rickettsia; spotted fever group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 742)

AUTHORS Betancourt,P., Martínez,H., Gil,J., Ospina,C., Olaya,I.A., Benavides,E., Bolanos,E., Cuervo,C., Blanton,L. and Hidalgo,M.

TITLE First report of Candidatus 'Rickettsia senegalensis' in fleas (*Ctenocephalides felis*) collected in domestic animals from Cauca, Colombia

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 742)

AUTHORS Betancourt,P., Hidalgo,M. and Cuervo,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-FEB-2019) Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7 43-82 Ed 53 Lab 401, Bogotá, Bogotá 110231, Colombia

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..742

/organism="Candidatus Rickettsia senegalensis"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="P127"

/host="Ctenocephalides felis (flea)"

/db_xref="taxon:1436799"

/country="Colombia: Santander de Quilichao, Cauca"

/collection_date="2017"

ORIGIN

<1..742

/gene="ompB"

ORIGIN

<1..742

/gene="ompB"

/codon_start=1

/translation_table=11

/product="outer membrane protein B"

/protein_id="OC536721.1"

/translation="IYGLGEEIGAPKXQVTFITDYMNLGSIATNATINDGVVTTGQVAGTDFDQKITLGSVNGNANVRFADGTFSDSTSHIVITKANNGTVTYLGSALVQNIIGSSDTPVASVKFTGSDDGAGLQNDIYSQVTFDFTYDGLVNSNVILGGTTAINGEIDL LNTLTLFANGTSTMGSDTSEIETTLTVANGNIGHIVIAENAQVNAITTTGTTINWQDNA NANFSGTQTYTLIQGGARFNGT LGGPNA"

ORIGIN

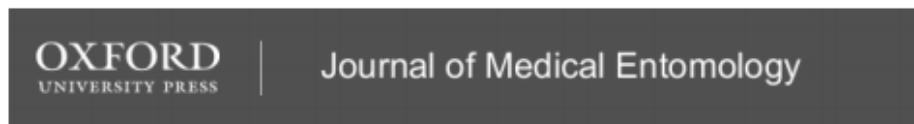
```
1 atttacgct tagtggaaga gattggagct ccaaaattaa agcaagtaac atttactaca
61 gactataaca acttaggtag tattatcgca actaacgcaa caattaatga cggcgtaac
121 gtactacag ttggtgtagc cggaaacagat ttcgacgcta aaattaccct tggagtggt
181 aacggtaacg ctaatgtaag atttgctgac ggtacatttt ctgattctac aagtatgatt
241 gtactacta aagtaataa cggtagtcta acttacttag gtagtgatt agtcggtaat
301 ataggtagtt cagatactcc tgtagcttct gttaaattta caggtagta tgaagggtca
361 ggattacaag gaaatattta ttcacaagtc acagactttg gtacttatga cttagggttt
421 ttaaattcta acgtaatttt aggcgggtgt actaccgcta ttaacgggta aatcgatctt
481 cttacaataa ccttaacatt tgcaaacggt acttcaacat ggggaagcga tacttctatt
541 gaaactactt taacagtacg aaatggtaat ataggtcaca tcgttattgc ggaataatgct
601 caagttaatg caacaactac aggaaccaca accatcaacg tacaagataa tgccaatgca
661 aatttcagcg gtacacaaac ttatacttta atccaaggtg gtgctagatt taacggtagt
721 ttaggaggtc ctaactttgc tg
```

//

Anexo 5

Producción científica #1 —Betancourt-R, P; Martinez, Heidy; Gil, Juliana; Ospina, Maria Catalina; Olaya-M, Luz Adriana; Bolaños, Eliana; Cuervo, Claudia; Blanton, Lucas; Hidalgo, Marylin (2019)

First Report of Candidatus Rickettsia senegalensis in Fleas (Ctenocephalides felis) Collected in Dogs and Cats from Cauca, Colombia (Artículo sometido)



First Report of Candidatus "Rickettsia senegalensis" in Fleas (Ctenocephalides felis) Collected in Dogs and Cats From Cauca, Colombia

Journal:	Journal of Medical Entomology
Manuscript ID	JME-2019-0214
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	05-Jun-2019
Complete List of Authors:	Betancourt-R, Paola; Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología Martinez, Heidy; Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología Gil, Juliana; Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología Ospina, Maria Catalina; Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias Olaya-M, Luz ; Universidad Libre - Campus Cali, Seccional Cali Benavides, Efrain; Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias Bolaños, Eliana; Secretaria departamental de Salud, Cauca, Cauca Cuervo, Claudia; Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología Blanton, Lucas; University of Texas Medical Branch at Galveston, Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine Hidalgo, Marylin; Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología
Please choose a section from the list:	Molecular Biology/Genomics
Field Keywords:	Vector-Borne Pathogens, Tropical Entomology
Organism Keywords:	Rickettsia, Fleas

SCHOLARONE™
Manuscripts