

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



“Comparación Genómica de *Rickettsia rickettsii* en humanos de Mexicali, B.C., y Banco de Genes”

TESIS:

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA:

VALERIA LÓPEZ VILLARREAL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS TINOCO GRACIA

ASESORES:

DRA. SAWAKO OSHIMA

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

Comparación Genómica de la bacteria *Rickettsia rickettsii* en humanos de Mexicali, B. C., Y Banco de Genes. Tesis presentada por Valeria López Villarreal como requisito para la obtención de grado de Maestra en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

**DR. LUIS TINOCO GRACIA
DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA
SECRETARIO**

**DRA. SAWAKO OSHIMA
SINODAL**

**DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO
SINODAL**

**DR. ALBERTO BARRERAS SERRANO
SINODAL**

MEXICALI, B. C., MÉXICO, JUNIO DE 2021

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor:

Agradezco infinitamente a mi tutor Dr. Luis Tinoco Gracia por darme la oportunidad de trabajar y apoyarlo con una parte de todos sus proyectos sobre salud pública, específicamente en el área de rickettsias que son un tema muy importante. Le agradezco por su tiempo, su paciencia, su comprensión, sus palabras de apoyo y ánimo en todo momento. Gracias por siempre valorar mi esfuerzo y apoyarme doctor.

A mis asesores:

Dra. Sawako Oshima; Muchísimas gracias por su apoyo en todo momento, por el tiempo que nos dedicaba a pesar de usted estar cansada y tener un sin fin de proyectos a realizar. Gracias por paciencia y su apoyo constante, ya que es un tema muy complicado y difícil de procesar en un periodo tan corto.

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto; Muchas gracias por ayudarme con temas que no entendía y gracias por darnos ejemplos y guías para resolver nuestros problemas.

A mis compañeros de maestría:

Karen, Lester, Ramón, Omar, David, Christian, Daniel, Hardy; Muchas gracias por siempre ser un apoyo moral, y por ser un grupo super unido al momento de trabajar juntos.

A mi familia:

Agradezco siempre a mi mamá, mi papá y mis hermanos que a pesar de estar lejos de mí siempre me apoyaron en todo lo que necesité y me ayudaron con sus palabras emotivas todo el tiempo.

Agradezco a CONACYT por la beca que me otorgó, al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, a la coordinación de posgrado, por las facilidades otorgadas para realizar esta maestría y la ayuda que siempre brindaron.

DEDICATORIA

A mi familia que siempre ha estado para apoyarme.

RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo para la comparación genómica de la bacteria *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*) en el Municipio de Mexicali, Baja California, en el cual se realizó la extracción de ADN de 24 muestras sanguíneas de pacientes humanos positivos a *Rickettsiosis* obtenidas del banco de sangre del laboratorio de salud pública que se encuentra en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) del programa de educación preventiva de *Rickettsiosis*, la extracción se realizó con los siguientes iniciadores: Gen *gltA* (401 pares de base) para el género *Rickettsia*, gen *17Kda* (246 pares de base) con mediana especificidad para el género *R. rickettsii*, y gen *ompA* (532 pares de base) específica para *R. rickettsii*. A partir de esto y continuando con el proceso de amplificación del ADN por medio de la realización de PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en ingles), el proceso de electroforesis y la observación en el transiluminador se eligieron 3 de las muestras más intensas y se procedió a la purificación de los productos del PCR, al envío a secuenciación de estos productos al laboratorio de Eurofin Genomics y la lectura de la información de las muestras que se enviaron al laboratorio, en las cuales se encontraron diferencias que pueden ayudar para los siguientes proyectos destinados a la investigación de la bacteria *R. rickettsii*; Al igual que ayuda a continuar la comparación genómica entre los diferentes países que ya realizaron investigaciones con esta bacteria y tienen documentación importante agregada al banco de genes del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y de esta forma realizar la búsqueda de una vacuna específica para esta bacteria.

ABSTRACT

A descriptive study for the genomic comparison of the bacterium *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*) was carried out in the Municipality of Mexicali, Baja California, in which DNA extraction was performed from 24 blood samples from human patients positive for *Rickettsiosis* obtained from the blood bank from the public health laboratory located at the Veterinary Science Research Institute (IICV) of the *Rickettsiosis* preventive education program, the extraction was performed with the following primers: *gltA* gen (401 base pairs) for the genus *Rickettsia* , *17Kda* gen (246 base pairs) with median specificity for the *R. rickettsii* genus, and *ompA* gen (532 base pairs) specific for *R. rickettsii*. From this and continuing with the DNA amplification process by the PCR (Polymerase Chain Reaction), the electrophoresis process and the observation in the transilluminator, 3 of the most intense samples were chosen and the PCR products were purified, these products were sent to the Eurofin Genomics laboratory for sequencing, in which differences were found may help for the following projects for the investigation of the bacterium *R. rickettsii*; As well as it helps to continue the genomic comparison between the different countries that have already carried out research with this bacterium and have important documentation added to the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and thus carry out the search for a specific vaccine for this bacterium.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	3
OBJETIVO.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Agente etiológico.....	4
Vectores.....	4
Epidemiología.....	6
Patogénesis de rickettsias	7
Genoma de rickettsias.....	8
Métodos de diagnóstico.....	11
Genotipificación de cepas de <i>R. rickettsii</i>	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	18

CONCLUSIONES.....	20
LITERATURA CITADA.....	21
ANEXOS.....	25

INDICE DE CUADROS

Cuadro	página
1. Características principales de los genomas de riquetsia transmitidos por garrapatas actualmente disponibles.....	9
2. Genomas para genotipificación y comparación.....	14
3. Iniciadores utilizados para secuenciación de <i>R. rickettsii</i>	16
4. Comparación de muestras secuenciadas con genes para <i>R. rickettsia</i> ...	17

INDICE DE FIGURAS

Figura	página
1. Ciclo de vida de <i>Rickettsia rickettsii</i> en la garrapata y en el mamífero hospedero.....	5

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las rickettsiosis transmitidas por garrapatas son reconocidas como enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes alrededor del mundo. Algunas de estas enfermedades pueden ser potencialmente mortales si no son tratadas de forma adecuada y oportuna, con tasas de letalidad del 23-85% por ejemplo en el caso de la infección por *Rickettsia rickettsii*, siendo la especie más patógena del género, transmitida por garrapatas y restringida geográficamente a las Américas (Renvoisé, 2009). El diagnóstico temprano de la enfermedad, es importante para poder ofrecer un tratamiento oportuno, ya que es probable que se estén presentando casos de rickettsiosis en humanos y estos no estén siendo diagnosticados correctamente.

En el ámbito de la salud pública, la comparación genómica es de importancia para la observación de variaciones en el genoma, identificación de genes que pueden estar involucrados en la virulencia de la bacteria, inserciones/deleciones de pares de base, entre otros. De tal forma se puede obtener información detallada para realizar medidas de control y prevención para vectores y agentes causales. Y de esta forma, alertar a poblaciones en riesgo y generar conciencia sobre la letalidad de esta bacteria al no ser atendida a tiempo durante los primeros síntomas.

El banco de genes del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) contiene información de utilidad para continuar las investigaciones sobre el genoma de *R. rickettsii* en Mexicali, B. C. Ya que este contiene información detallada sobre otros países que ya han realizado estudios sobre el genoma de esta bacteria y tienen hallazgos que ayudan a la comparación completa del genoma.

ANTECEDENTES

Para determinar qué genes pueden estar involucrados en la virulencia de *R. rickettsii*, se determinó la secuencia genómica de *R. rickettsii* Iowa (banco de genes CP000766) con 1, 268,175 pares de base; contenido de G (Guanina) + C (Citocina) = 411,482 bases; contenido de G + C (%) = 32.45 y se comparó con la de *R. rickettsii* Sheila Smith (CP000848) 1,257,710 pares de base; contenido de G + C = 408,346 bases; contenido de G + C (%) = 32.47. Se observó un alto grado de identidad de secuencia (96.6%) para los dos genomas. Cuando se descuentan las regiones eliminadas, la identidad entre los dos genomas es del 99%. A pesar del alto grado de identidad entre los dos genomas, se identificaron varias inserciones, deleciones y polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) específicos (Ellison et al., 2007; Felsheim et al., 2009; Kleba et al., 2010).

15 aislamientos de Fiebre Manchada Brasileña (BSF) en pacientes (13 casos fatales) del estado de São Paulo se identificaron como *R. rickettsii*, con secuencias de ADN: *gltA* (737 nucleótidos), *ompA* (491 nucleótidos) y *ompB* (787 nucleótidos) estos eran 100% idénticas entre sí y correspondientes al genoma de *R. rickettsii* Brasil (CP003305) con 1, 255,681 pares de base; contenido de G + C (%) = 32.5. Mientras que las secuencias de *ompA* también fueron 100% idénticas a las secuencias correspondientes de *R. rickettsii* de América del Norte (*Sheila Smith* y *Iowa*), las secuencias parciales de *ompB* fueron 100% idénticas a la norteamericana de *Sheila Smith* y, al mismo tiempo, difería de otras norteamericanas, por ejemplo, *Iowa* y *Arizona* (CP000766 y CP003307) por un polimorfismo de un solo nucleótido. Las secuencias *gltA* de los 15 aislamientos de humanos brasileños diferían en un codón extra (CGG) en comparación con las norteamericanas (Labruna et al., 2014).

En marzo de 2006 se notificó, sobre la ocurrencia de 3 casos fatales de síndrome febril hemorrágico con compromiso pulmonar agudo en Antioquia, Colombia. Posteriormente, a diagnósticos diferenciales y signos clínicos se sospecha de rickettsiosis que fue confirmada por el laboratorio de Atlanta en 7 de los 14 casos estudiados para *Rickettsia rickettsii* Colombia (CP003306.1) con 1, 270,083 pares de base; contenido de G + C (%) = 32.50. 3 soldados y 2 civiles fallecieron por la enfermedad (Acosta et al., 2006).

Cabe mencionar que Mexicali, B.C. no cuenta con un estudio sobre características encontradas en el genoma de esta bacteria como ejemplo alguna delección o inserción, un codón extra, entre otros. Y a causa de falta de estudios aún son grandes las incógnitas sobre la virulencia y genes específicos que la puedan causar.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO GENERAL

Considerando los hechos ya mencionados, el objetivo de este trabajo es una comparación genómica de la bacteria *Rickettsia rickettsii* con resultados obtenidos en Mexicali, B. C. y en la base de datos del banco de genes del NCBI de países como Estados Unidos de América, Brasil, Colombia, entre otros. Con el propósito de marcar las diferencias encontradas y / o similitudes y de esta forma realizar la búsqueda de una vacuna específica para esta bacteria.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Realizar una comparación genómica con las muestras más intensas y positivas a los genes *gltA*, 17 kDa y *ompA* obtenidas del laboratorio de salud pública veterinaria, las cuales fueron enviadas al laboratorio de Eurofin Genomics para su secuenciación, y en base a los datos ya registrados en el banco de genes del NCBI, realizar la comparación deseada entre los diferentes países con registros de utilidad.

REVISIÓN DE LITERATURA

Agente etiológico

Las rickettsias son microorganismos que comparten características tanto de las bacterias como de los virus. Al igual que las bacterias, tienen enzimas y paredes celulares, utilizan oxígeno y pueden ser controladas o destruidas por los antibióticos. Al igual que los virus, pueden vivir y multiplicarse sólo dentro de las células (Martinez et al. 2005).

R. rickettsii, bacteria gram negativa intracelular obligada con medidas de 0.8-2.0 µm por 0.3-0.05 µm. Estas bacterias se relacionan a artrópodos, y son capaces de infectar a vertebrados, incluyendo los humanos, generalmente como huéspedes accidentales (La Scola y Raoult, 1997).

Para ser más específicos; en cuanto al género, *Rickettsia* se divide en dos grupos muy importantes antigénicamente en función de sus lipopolisacáridos: el grupo tifus y el grupo de fiebre manchada de las montañas rocosas. La proteína A de membrana externa rickettsial inmunodominante (*ompA*) existe solo en el grupo de fiebre manchada. Otra proteína importante de la membrana externa, *ompB*, existe en todas las especies de *Rickettsia*. *ompA* (190 kDa) y *ompB* (135 kDa) contienen epítomos de reactividad cruzada y específicos de especie que proveen las bases para la serotipificación de las rickettsias con la utilización de ensayos microinmunofluorescentes indirectos. Datos obtenidos del genoma podría ayudar en el desarrollo de vacunas y de nuevas herramientas de diagnóstico (Walker, 2007) (Weinert et al., 2009).

Vectores

El principal vector y reservorio de la fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR) es la garrapata. *Rickettsiae* son capaces de infectar y multiplicarse en casi cualquier órgano del hospedero invertebrado. Cuando los ovarios y los oocitos de una garrapata hembra se infectan, las *rickettsiae*

pueden ser transmitidas de manera transovarial (rango de 30-100%) a su progenie. El porcentaje de huevecillos infectados de una hembra infectada puede variar dependiendo de factores que aún están por aclararse (Burgdorfer & Varma 1967; Burgdorfer & Brinton 1975). Una vez infectado el huevecillo, permanece infectado durante todos los estadios de la garrapata es decir se presenta una transmisión transestadial (Figura 1). Al infectarse las glándulas salivales de la garrapata esta puede infectar a su hospedero vertebrado vía saliva durante la hematofagia, por lo tanto, todos los estadios; larval, ninfa y adulto pueden ser potenciales infectivos para su hospedero vertebrado (D Raoult & Roux 1997) (McDade, 1986).

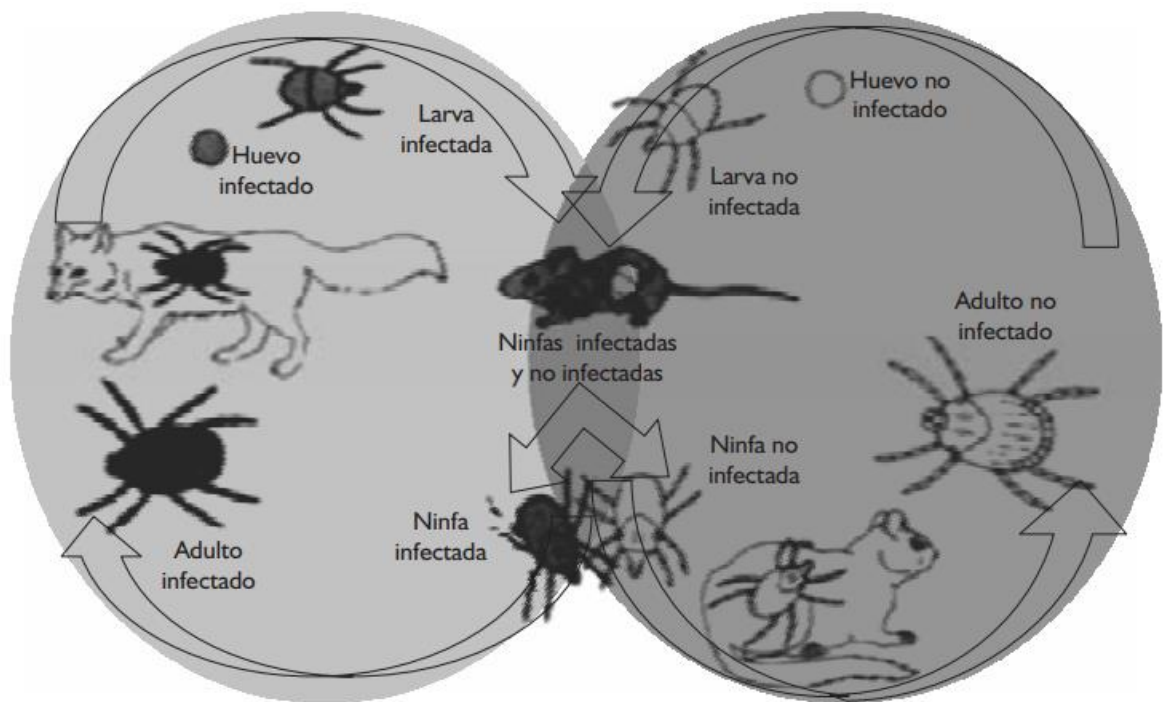


Figura 1. Ciclo de vida de *Rickettsia rickettsii* en la garrapata y en el mamífero hospedero (McDade, 1986).

El reservorio natural de *R. rickettsii* incluye varios géneros y especies de la familia *Ixodidae*; por ejemplo: la garrapata del perro americano (*Dermacentor variabilis*) es el vector primario en la mayor parte de los Estados Unidos de América, también encontramos la especie *Dermacentor andersoni*. La garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) vector primario de *R. rickettsii* en

México. La garrapata cayenne (*Amblyomma cajennense*) es el principal vector de *R. rickettsii* en Centro y Sudamérica. Sin embargo, se sospecha que existen otras especies de garrapatas involucradas en la transmisión de *R. rickettsii* (Dantas-Torres, 2007).

Epidemiología

La epidemiología y distribución geográfica de las riquetsiosis transmitidas por garrapatas, está estrechamente relacionada con la presencia de sus artrópodos vectores, especialmente cuando estos cumplen el papel de reservorios primarios de riquetsia (Merhej et al. 2014).

El agente etiológico de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) se distribuye de manera amplia, aunque con poca frecuencia, en garrapatas duras en todo el hemisferio occidental. En América del Norte y Central, los casos confirmados de RMSF se han documentado en Canadá, Estados Unidos, México, Panamá y Costa Rica. En México, FMMR se ha reportado en los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Durango, Coahuila y Yucatán. Los focos hiperendémicos se han descrito repetidamente en comunidades en el suroeste de Estados Unidos y el norte de México, vinculados directamente a un gran número de garrapatas *R. sanguineus* infectadas con *R. rickettsii* que resultan de poblaciones no controladas de perros callejeros y de propietarios con perros donde estos no tienen una restricción en salidas (Dantas-Torres, 2007).

En el estado de Yucatán en abril del 2006 se documentó un caso de fiebre manchada de las montañas rocosas, el cual fue publicado en *Emerging Infectious Diseases*, el caso fue fatal y además identificaron por PCR el agente etiológico *R. rickettsii* (Zavala-Castro 2006).

En Nuevo León específicamente en el Municipio de Linares, por primera vez se aisló una riquetsia utilizando técnicas modernas de cultivo celular y biología molecular. Se identificó la riquetsia comparando material genético con la base de datos de instituto nacional de biotecnología de los estados unidos. Se

caracterizo la ultra-estructura usando técnicas de microscopia electrónica. Este fue el primer caso publicado de un aislamiento por cultivo celular en México (Medina-Sánchez, 2005).

Sin embargo, en México la investigación acerca de las fiebres por rickettsia o rickettsiosis, no ha sido ampliamente estudiada, quizás debido a la necesidad de infraestructuras, modernas, equipadas y controladas, para el manejo de este microorganismo, que está considerado como un agente de bioseguridad nivel 3.

Patogénesis de rickettsias

La inoculación del microorganismo se produce de forma directa desde las glándulas salivares mediante la picadura, en el caso de las rickettsias transmitidas por garrapatas de especies pertenecientes al grupo de fiebre manchada (GFM) y ácaros (*R. akari*), o por medio de la inoculación accidental de heces contaminadas tanto de piojos (*R. prowazekii*) como de pulgas (*R. typhi* y *R. felis*), al entrar en contacto con abrasiones cutáneas o conjuntivas (Xue-Jie y Walker, 2006). Dentro del torrente sanguíneo, las células endoteliales son el blanco principal de infección, a excepción de *R. akari* (tropismo por los macrófagos), aunque también otras células se pueden ver afectadas (perivasculares, monocitos y hepatocitos) (Uchiyama, 2012). Proteínas como los antígenos de superficie celular y la proteína riquetsial de membrana externa A (*ompA*), actúan como mecanismos de adhesión; sin embargo, la *ompB* cumple un papel fundamental al unirse de forma específica al ligando celular Ku70 con el fin de que se inicie el proceso de internalización mediante fagocitosis. Dentro del citoplasma, las riquetsias escapan al fagosoma; Especies pertenecientes al GFM, también pueden invadir el núcleo y desarrollar un movimiento intracelular y de dispersión intercelular (posterior replicación por fisión binaria) mediante proteínas polimerizantes de actina como la RickA (asociada al complejo Arp2/3) y Sca2 (Mansueto et al., 2012; Reed et al., 2014).

Por el contrario, las especies pertenecientes al grupo tifus (GT), aparte de carecer de la *ompA*, no tiene la capacidad de polimerizar actina, por lo cual únicamente se multiplican en el citoplasma (Mansueto et al., 2012). La consecuencia final del paso intercelular a través de las células endoteliales (GFM) y la multiplicación excesiva intracitoplasmática (GT), lleva a la disrupción y daño endotelial directo, lo cual se traduce en una vasculitis de pequeños y medianos vasos, característica patognomónica de la infección por estos microorganismos (Sahni et al., 2013).

Genoma de rickettsias

Los tamaños de los genomas de rickettsias son pequeños y sus secuencias están disponibles para la mayoría de las especies validadas. Actualmente, hay disponibles genomas de 23 de las 26 especies validadas de rickettsia, y para 11 de estas especies, se encuentran disponibles genomas de 2 a 8 aislados (Cuadro.1) En comparación con los genomas de las bacterias de vida libre, los genomas rickettsiales exhiben varias propiedades inusuales. Estos genomas son pequeños, desde 1.11 Mb hasta 2.1 Mb. Su contenido en G + C es bajo y varía de 29% (*R. typhi*) al 33% (*R. endosimbionte* de *I. scapularis*) (Merhej et al., 2009).

El tamaño del genoma y el contenido genético de las bacterias en relación con su estilo de vida, demostraron que la degradación del genoma, especialmente la pérdida de genes, ha sido una fuerza impulsora en la adaptación de las rickettsias y otras bacterias intracelulares para vivir dentro de las células eucarióticas. Al comparar el genoma de *Rickettsia africae*, organismo levemente patógeno en humanos, la especie más patógena *R. conorii*, *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia prowazekii*, la hipótesis de que la degradación del genoma en rickettsias se asoció con el aumento de la virulencia (Fournier et al., 2003).

Sin embargo, los genomas rickettsiales también contienen una variedad de genes o fragmentos de ADN repetidos o duplicados; Los genomas rickettsiales

contienen repeticiones palindrómicas, módulos que codifican sistemas de secreción de tipo IV, tetratricopeptide que posiblemente desempeñan un papel en la patogenicidad al mediar interacciones con células eucariotas, módulos de toxina-antitoxina (TA) y genes paralógicos (Merhej et al., 2011).

Además, se han identificado varios elementos genéticos móviles. Estos elementos incluyen plásmidos en al menos 10 especies, aunque anteriormente se pensaba que las rickettsias carecían de plásmidos. Un aspecto notable de los plásmidos de rickettsia es que hay múltiples plásmidos en varias especies (como en *R. felis*, *R. helvética*). Además, los plásmidos en *rickettsiae* pueden ser polimórficos, como se observa para *Rickettsia felis*, donde existe un plásmido en forma de 62 kb y de 39 kb (Baldrige et al., 2008) (Ogata et al., 2005).

Cuadro 1. Características principales de los genomas de rickettsia transmitidos por garrapatas actualmente disponibles (Parola et al., 2013).

Species	Strain	Rickettsiosis	Chromosome size (kb)	No. of ORFs	G+C content (%)	Noncoding DNA (%)
<i>R. africae</i>	ESF-5	African tick bite fever	1,278,540	1,260	32.4	28
<i>R. australis</i>	Phillips	Queensland tick typhus	1,297,390	1,110	31.7	26
	Cutlack	Queensland tick typhus	1,296,670	1,297	32.3	NA
<i>R. bellii</i>	OSU 85-389	Unknown pathogenesis	1,528,980	1,470	32	20
	RML369-C		1,522,076	1,429	31.7	14.8
<i>R. canadensis</i>	McKiel	Unknown pathogenesis	1,159,722	1,129	31.1	26
	CA410	Unknown pathogenesis	1,150,228	1,052	31	NA
<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	Malish Seven	Mediterranean spotted fever	1,268,755	1,374	32.4	19
<i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i>	ITTR	Indian tick typhus	1,249,482	1,157	32.5	19.1
<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	A-167	Astrakhan fever	1,260,331	1,210	33	18.8
<i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	ISTTCDC1	Israeli spotted fever	1,252,815	1,164	32	20.0
<i>R. heilongjiangensis</i>	054	Far-Eastern tick-borne rickettsiosis	1,278,471	1,297	32.3	17
<i>R. helvetica</i>	C9P9	Unnamed rickettsiosis	1,369,827	1,135	32.2	15.9
<i>R. honei</i>	RB	Flinders Island spotted fever	1,268,758	1,284	32.4	19
<i>R. japonica</i>	YH	Oriental spotted fever	1,331,743	1,239	32.7	28
	YH	Oriental spotted fever	1,283,087	1,010	32.4	NA
<i>R. massiliae</i>	Mtu5	Unnamed rickettsiosis	1,360,898	1,436	32.5	31
	AZT80	Unknown pathogenesis	1,263,719	1,243	32.6	NA

<i>R. montanensis</i>	OSU 85-930	Unknown pathogenesis	1,279,798	1,254	32.6	NA
<i>R. parkeri</i>	Portsmouth	<i>R. parkeri</i> rickettsiosis	1,300,386	1,354	32.4	NA
<i>R. peacockii</i>	Rustic	Unknown pathogenesis	1,288,492	984	33	NA
<i>R. philipii</i>	364D	Unnamed rickettsiosis	1,287,740	1,380	32.5	NA
<i>R. raoultii</i>	RpA4	SENLAT	1,275,089	1,355	32.5	15.4
<i>R. rhipicephali</i>	3-7-female6-CWPP	Unknown pathogenesis	1,290,368	1,302	32.4	NA
<i>R. rickettsii</i>	Sheila Smith	Rocky Mountain spotted fever	1,257,710	1,382	32.4	24
	Iowa	Avirulent	1,268,175	1,421	32.4	NA
	Arizona	Rocky Mountain spotted fever	1,267,197	1,380	32.4	NA
	Brazil	Rocky Mountain spotted fever	1,255,681	1,369	32.5	NA
	Colombia	Rocky Mountain spotted fever	1,270,083	1,387	32.5	NA
	Hlp#2	Unknown pathogenicity	1,270,751	1,345	32.5	NA
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	BJ-90	Siberian tick typhus	1,254,013	1,182	32.5	17.5
	246		1,250,021	1,151	32.5	17.3
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>	HA-91	Lymphangitis-associated rickettsiosis	1,252,337	1,138	32.4	18.5
<i>R. slovacae</i>	13-B	Tick-borne lymphadenitis	1,275,089	1,323	32.5	18.7
	D-CWPP	Tick-borne lymphadenitis	1,275,720	1,386	32.5	NA
<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Ixodes scapularis</i>		Unknown pathogenesis	1,821,709	2,059	31	22

Las especies de rickettsia también contienen hasta 5 autotransportadores, proteínas con 3 dominios, una secuencia líder que media el transporte a través de la membrana celular, una secuencia del pasajero y una secuencia transportadora que se inserta como un barril β en la envoltura exterior para transportar al pasajero a la superficie exterior de la pared celular. Entre los autotransportadores, la proteína de membrana externa (omp) A está presente solo en las rickettsias en el grupo de la fiebre manchada, y ompB está presente en todas las especies de *Rickettsia*. Sca 1, Sca 2 y Sca 3 existen como genes divididos (interrumpidos en 2–4 marcos de lectura abiertos) en al menos 1 especie de *Rickettsia*. Sca 4, que comparte la similitud de secuencia, no es un autotransportador, porque carece del dominio del transportador (MacLeod et al., 2004).

Métodos de diagnóstico

Las pruebas serológicas siguen siendo el método más fácil, más utilizado y más ampliamente disponible para el diagnóstico de la rickettsiosis. Se pueden usar ensayos serológicos más sofisticados, como las técnicas de absorción cruzada (AC) y Western blotting (WB), para ayudar a diferenciar las infecciones rickettsiales mediante la evaluación de anticuerpos, pero estos métodos solo están ahora disponibles en el centro de colaboración de la OMS en Marsella, Francia. Aunque el cultivo es menos sensible que la serología y PCR cuantitativo (qPCR) para el diagnóstico de la rickettsiosis transmitida por garrapatas, recientemente se ha demostrado que las muestras de biopsia de piel (de erupción y/o escara) cultivadas en un centro de referencia pueden ser positivas incluso cuando las pruebas son negativas y que un resultado negativo por el uso de ensayos moleculares no excluye el diagnóstico de rickettsiosis (Angelakis et al., 2012).

La prueba serológica por medio de IFI (inmunofluorescencia indirecta) es el método de referencia. Sin embargo, aunque es de fácil acceso y manejo, es de utilidad diagnóstica retrospectiva y, debido a las características antigénicas compartidas, presenta reacciones cruzadas entre las diferentes especies del género *Rickettsia*, sobre todo cuando pertenecen a un mismo grupo (grupo de las fiebres manchadas, grupo del tifus, etc.). Esta es la prueba más utilizada en las Américas para estudios de seroprevalencia y como método diagnóstico frente a infecciones por rickettsias.

Otro método en el cual se utilizan muestras de suero, es el Western Blot asociado a inmunoabsorción cruzada. Tiene la ventaja de identificar la especie de riquetsia involucrada en determinada infección, descartando reacciones cruzadas con otras especies. Esta prueba se basa en la absorción de anticuerpos homólogos y heterólogos presentes en el suero del paciente que, posteriormente, son verificados por medio del Western Blot al unirse o no hacerlo a proteínas antigénicas de las diferentes especies de riquetsia. Si se presenta la absorción de ambos anticuerpos, la especie de riquetsia utilizada en la mezcla con el suero,

se identifica como el agente etiológico; mientras que, si únicamente se remueven los anticuerpos heterólogos, la especie en la mezcla se identifica como el agente causal de la reacción cruzada, este es un método costoso y que requiere de tiempo considerable de dedicación (Raoult y Parola, 2007).

La inmunohistoquímica, el cultivo celular y la amplificación por medio de qPCR y PCR convencional de genes conservados del género *Rickettsia*, son utilizados con mayor frecuencia en el mundo, de forma única y en combinación, siendo posible la determinación de las especies patógenas de rickettsia, de una forma rápida, eficaz y directa. Estos métodos son los únicos que pueden proveer un diagnóstico acertado durante la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, las muestras de mayor accesibilidad en los pacientes, como las de sangre, no suelen contener el suficiente número de microorganismos para su adecuada amplificación y caracterización. La mayor utilidad de estos métodos está en casos con lesiones dermatológicas que se prestan para practicar biopsia y que contienen considerable número de microorganismos viables, como la escara de inoculación (Raoult y Parola, 2007).

Genotipificación de cepas de *R. rickettsii*

Las comparaciones de la virulencia de cepas "orientales" versus "occidentales" en sistemas de modelos animales sugirieron una enfermedad menos grave causada por cepas orientales, aunque existe una variación significativa en la virulencia. Las bases moleculares para estas diferencias en la virulencia son desconocidas. Con sistemas genéticos limitados, ha sido difícil identificar los factores de virulencia en *R. rickettsii*. Se han identificado varias diferencias genómicas entre la cepa virulenta de *R. rickettsii* Sheila Smith y la avirulenta *R. rickettsii* Iowa, incluida la ausencia de proteína riquetsial de membrana externa A (ompA) de la avirulenta (Cuadro 2). Esta comparación reveló distinciones importantes, el número de polimorfismos hace que sea difícil

determinar cuáles son los responsables de la variación en la virulencia entre estas dos cepas (Ellison et al., 2008).

Distinción genómica de cepas virulentas y avirulentas de *R. rickettsii*. Las dos cepas occidentales, *Sheila Smith* y *R*, mostraron un alto grado de identidad, mientras que las dos cepas orientales (*Morgan* e *Iowa*) fueron más similares entre sí. Sin embargo, las dos cepas occidentales eran casi tan diferentes de la virulenta cepa *Morgan* como lo eran de la avirulenta cepa *Iowa*. En particular, ambas cepas occidentales mostraron la delección de 10 kb que se superpone a los restos de una proteína de membrana integral predicha que está intacta en otras especies rickettsiales. Exclusivo de esta gran eliminación, hubo aproximadamente un 99% de identidad entre las cuatro cepas de *R. rickettsii*. Solo 12 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no sinónimo (*ompA*), seis SNPs sinónimos y ocho SNPs en regiones intergénicas distinguieron a *Sheila Smith* de la cepa *R*. Una única inserción en el marco de 588 pb en una hipotética proteína que contiene repeticiones de anquirina de S. S. también distinguió estas dos cepas. De manera similar, solo ocho SNPs no sinónimo distinguieron específicamente las cepas *Morgan* y *Iowa* (diferencias de secuencia que se observaron solo en la cepa de *Iowa* y ninguna de las cepas virulentas se redujeron más adelante). Ocho inserciones / delecciones, cinco en regiones no codificantes y tres regiones codificantes, completan estas incidencias entre *Iowa* y *Morgan*. Solo 10 SNP no sinónimo son exclusivos de la cepa *Iowa*, al igual que 8 SNP sinónimos y 11 SNP en regiones no codificadas. Una eliminación de un solo nucleótido del gen *ompA* cambia el marco de lectura abierto de *Iowa* y evita la expresión de *ompA*.

Las cepas virulentas pueden contener una disminución adicional de la liberación de 891 pb en *ompA* que la diferencia de la cepa de *Iowa*. Una proteína que contiene repetición de anquirina (RrIowa_290) está truncada en la cepa *Iowa*, pero una transición A a G restaura el marco de lectura abierto en cada una de las cepas virulentas (Ellison et al., 2008) (Anderson et al., 1990).

Cuadro 2. Genomas para genotipificación y comparación (Ellison et al., 2008)

Banco de genes número de acceso	Genomas de <i>R. rickettsii</i>	Kb	ORF's	Cepa
(CP000766.3)	<i>Iowa</i>	1.268.201	1,567	avirulenta
(CP000848.1)	<i>Sheila Smith</i>	1.257.710	1,382	virulenta
(CP003307.1)	<i>Arizona</i>	1.267.197	1,380	virulenta
(CP003305.1)	<i>Brazil</i>	1.255.681	1,369	virulenta
(CP003306.1)	<i>Colombia</i>	1.270.083	1,387	virulenta
(CP003311.1)	<i>Hlp#2</i>	1.270.751	1,345	virulenta
(CP006010.1)	<i>Morgan</i>	1.269.809	-	virulenta
(CP006009.1)	<i>R</i>	1.257.005	-	virulenta

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó acabo en Mexicali, Baja California, en el laboratorio de salud pública veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, el cual incluyó un análisis previo de 24 muestras sanguíneas de pacientes humanos positivos a *Rickettsiosis* y 1 muestra de tejido de un mismo paciente positivo, obtenidas del banco de sangre del laboratorio de salud pública del programa de educación preventiva de *Rickettsiosis*; Donde al terminar la evaluación de las muestras, se tomó la decisión de tomar 3 de las muestras más intensas para su purificación y envío a secuenciación al laboratorio de Eurofin Genomics. La duración del estudio fue de 23 meses, del 1 de agosto del 2019 al 09 de junio del 2021, debido a la actual pandemia.

Una vez se recibió la información del laboratorio de Eurofin Genomics se procedió a la revisión de literatura en el NCBI, al análisis de los datos obtenidos en las muestras utilizando la aplicación de BioEdit para observar y evaluar el cromatograma, alineación de las secuencias, detectar cambios en las secuencias, entre otros. Tambien se utilizó otra aplicación llamada BLAST.NCBI para la comparación de la secuencias ya alineadas y listas para comparar; para poder determinar diferencias y/o similitudes que encontradas en las muestras.

METODOLOGÍA

Con 24 muestras sanguíneas se realizó la extracción de ADN con el kit DNeasy Blood & Tissue (250) (QIAGEN, Hilden, Germany) con las siguientes modificaciones: en el proceso de precipitación de ADN, la incubación con termo-mezclador a 70°C por 15 minutos y centrifugar por 3 segundos. Para los genes de 17kDa, *ompA*, y *gltA* de *R. rickettsii* (Cuadro 4). Se prosiguió a colocar las extracciones en el termociclador (TECHNE-GENIUS) el cual está programado para realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de ADN descritos por Tzianabos et al. 1989. Una vez finalizado el proceso de amplificación de ADN, se prosiguió a la realización de electroforesis (Thermo Scientific Owl B2) utilizando un gel de agarosa al 1.5% (Agarose LE, Analytical Grade Promega) en solución amortiguadora TAE 1X (Tris acetato, EDTA), utilizando SafeView Classic (Applied Biological Materials). Se observó ADN rickettsial en las muestras amplificadas utilizando un transiluminador UV (Ultra Lum, Fisher Scientific). Al presenciar que las muestras presentaron bandas intensas y no tan intensas, se optó por recolectar 3 muestras con bandas muy intensas para realizar la purificación de estos productos de PCR con ADN rickettsial con BIONEER-AccuPrep®PCR/Gel Purification kit (K-3037, K-3038). Para después enviarlos a secuenciación al laboratorio de Eurofins Genomics en Louisville, Kentucky.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para secuenciación de *R. rickettsii*

<i>Rickettsia rickettsii</i>	Secuencia de oligonucleótidos 5'-3'	Tamaño amplificado (pb)
Gen 17Kda	Tz-15-19(5'TTCTCAATTCGGTAAGGGC-3') Tz-16-20(5'ATATTGACCACTGCTATTTC-3')	246
Gen <i>gltA</i> (citrito sintasa)	CS-78 (5' GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT) CS-323 (5' GCTTCCTTAAATTCAATAAATCAGGAT)	401
Gen <i>OmpA</i>	Rr190.70p (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) Rr190.602n (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT)	532

RESULTADOS

Secuenciación comparativa

Cuadro 4. Comparación de muestras secuenciadas con genes para *R. rickettsia*

No. De muestras secuenciadas	Región analizada			No. De diferencias	% de identidad	Diferencia de secuencias		
	Principio	Final	Longitud				↑	↓
BMFJ34 -20 <i>gltA</i>	60	209	351	9	100 %	105 109 111 187 193 200 203 209	C T T C A T T A	T A C T G C A T
BMFJ35-110 <i>gltA</i>	50	360	677	0	100 %	296 360	- T	A -
BMFJ39-110 <i>ompA</i>	60	470	913	0	100 %	-	-	-
BMFJ40-118 <i>ompA</i>	120	520	914	2	99.75 %	158 483	C T	G G
BMFJ43- 110 <i>17kDa</i>	60	190	363	0	100 %	-	-	-
BMFJ44-118 <i>17kDa</i>	65	170	376	2	100 %	103 106	C T	A A

DISCUSIONES

Realizando las comparaciones por medio de BioEdit y tomando referencias de porcentajes de similitud encontrados en BLAST.NCBI se obtuvo la siguiente información:

BMFJ34 – muestra 20, gen *gltA*: La región analizada ya alineada fue de 351 pares de base en total; se inició en la posición número 60 y terminó en la posición 209, donde se observaron 9 diferencias en total en las diferentes posiciones ya mencionadas. El porcentaje de identidad se determinó realizando la comparación en el banco de genes de NCBI; Comparando en al menos 5 resultados, se observó que la muestra dio como resultado 100% de porcentaje de identidad para *Rickettsia sp*, *Rickettsia rickettsii*; Correspondiente a gen *gltA*; Query cover de 99%; E value de 2e-70; Y cada uno de los otros resultados evaluados tuvieron una longitud entre 350-1136 pares de base.

BMFJ35 - muestra 110, gen *gltA*: La región analizada y alineada fue de 677 pares de base en total; posición 50 a posición 360 donde no se observó alguna diferencia destacable; solo se encontraron 2 deleciones de par de base en diferentes posiciones que al verificar en el cromatograma se podía encontrar el par de base faltante y este coincidía con la secuencia alineada. En cuanto al porcentaje de identidad, se observó que la muestra tuvo un 100% de porcentaje de identidad para *Rickettsia sp*, *R. rickettsii* de las cepas *Morgan*, *R* y clon de cepa *Iowa*; Correspondiente a gen *gltA*; Query cover de 99%; E value de 2e-159; longitud de 382 – 1,268,242 pares de base; En donde la última longitud hace referencia al genoma completo de la bacteria *R. rickettsii*.

BMFJ39 - muestra 110, gen *ompA*: La región analizada y alineada fue de 913 pares de base en total; posición 60 a posición 470 donde no se observó alguna diferencia. En cuanto al porcentaje de identidad, se observó que la muestra tuvo 100% de identidad para *R. rickettsii*, correspondiente al gen de la

proteína de membrana *ompA*; Query cover de 100%; E value 0.0; longitud de 431 a 503 pares de base.

BMFJ40 – muestra 118, gen *ompA*: La región analizada y alineada fue de 914 pares de base en total; posición 120 a posición 520; donde se observaron 2 diferencias en las posiciones ya mencionadas. En el porcentaje de identidad, se observó que la muestra tuvo 99.75% de identidad para *R. rickettsii*, con el gen para la proteína de membrana *ompA*; Query cover de 100%; E value 0.0; longitud de 431 a 503 pares de base.

BMFJ43 - muestra 110, gen *17kDa*: La región analizada y alineada fue de 363 pares de base en total; en la posición 60 a posición 190; donde no se observó alguna diferencia. En el porcentaje de identidad se observó que la muestra tuvo 100% de identidad para *R. parkeri*, *Rickettsia sp.* Y *R. rickettsii*, con el gen de 17 kDa; Query cover de 100%; E value 7e-60; longitud de 434 a 1, 348, 030 pares de base. En donde la última longitud hace referencia a una cepa *R. parkeri* de la selva atlántica donde mencionan que es el genoma completo de la misma.

BMFJ44 – muestra 118, gen *17kDa*: La región analizada y alineada fue de 376 pares de base en total; en la posición 65 – 170; donde se observaron 2 diferencias en las posiciones ya mencionadas. En el porcentaje de identidad, se observó que la muestra tuvo 100% de identidad para *R. parkeri*, *Rickettsia sp.* Y *R. rickettsii*, con el gen de 17 kDa; Query cover de 100%; E value 4e-46; longitud de de 434 a 1, 348, 030 pares de base. En donde la última longitud hace referencia a una cepa *R. parkeri* de la selva atlántica donde mencionan que es el genoma completo de la misma.

CONCLUSIONES

Al comparar las muestras secuenciadas con los resultados en el banco de genes podemos concluir que, si hay diferencias, podemos encontrar inserciones, deleciones de pares de base, polimorfismos de un solo nucleótido; aunque sean mínimas entre cada resultado, pero las hay.

Rickettsia rickettsii es una bacteria con un genoma pequeño y difícil de descifrar siendo la amplificación la mejor opción para la obtención de información que la relacione con patogenicidad, ya que hasta la fecha no se ha logrado.

Existen muchas similitudes entre el género de *Rickettsia* y aún más en cada especie que se subdivide o que tiene un subgrupo de ella misma, ya que las diferencias varían alrededor de 1%.

Las rickettsiosis están distribuidas en general en el continente americano sin mostrar un patrón endémico. Al igual que las especies de garrapatas ya que se pueden encontrar varios géneros de estas en áreas donde no las encontraban antes o no sabían que había en ese lugar.

Hacen falta más estudios relacionados a *Rickettsia rickettsii* en particular y más en México sobre todo en regiones donde se ven afectadas como Mexicali, Sonora y Sinaloa.

LITERATURA CITADA

- Anderson, B. E., McDonald, G. A., Jones, D. C., Regnery, R. L. (1990). A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated near identical sequences. *Infect Immun.* 58:2760–2769.
- Anderson, J, F., Magnarelli, L.A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Diseases Clinics of North America.* 22:190-215.
- Angelakis, E., Richet, H., Rolain, J. M., La Scola, B., Raoult, D. (2012). Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging rickettsioses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1540.10.1371/journal.pntd.0001540.
- Baldrige, G. D., Burkhardt, N. Y., Felsheim, R. F., Kurtti, T. J., Munderloh, U. G. (2008). Plasmids of the pRM/pRF family occur in diverse *Rickettsia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:645–65.
- Dantas-Torres, F. (2007). Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect. Dis.* 7:724–732.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in Parasitology* 28:437-46. Del Fiol, F, S., Junqueira, F, M., Rocha, M.C.P., Toledo, M.I., Barberato, Filho, S. (2010). A febre maculosa no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 27:461-6.
- Ellison, D. W., Clark, T. R., Sturdevant, D. E., Virtaneva, K., Porcella, S. F., Hackstadt, T. (2008). Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infect Immun* 76:542–550 y 6:542– 550.

- Estripeaut, D., Aramburu, M. G., Saez-Llorens, X., Thompson, H. A., Dasch, G. A., Paddock, C. D., Zaki, S., Ereemeeva, M. E. (2007). Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1763–1765
- Faccini-Martínez, A.A., García-Álvarez, L., Hidalgo, M., Oteo, J.A. (2014). Syndromic classification of rickettsioses: An approach for clinical practice. *International Journal of Infectious Diseases.* (aceptado para publicación).
- Fournier, P. E., Dumler, J. S., Greub, G., Zhang, J., Wu, Y., Raoult, D. (2003). Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. Nov. *J. Clin. Microbiol.* 41:5456–5465.
- Fournier, P. E., V. Roux, and D. Raoult. (1998). Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:839-849.
- Hidalgo, M., Faccini-Martínez, A.A., Valbuena, G. (2013). Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. *Biomedica.* 33:160-78.
- Mansueto, P., Vitale, G., Cascio, A., Seidita, A., Pepe, I., Carroccio, A., di Rosa, S., Rini, G.B., Cillari, E., Walker, D.H. (2012). New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. *Clinical and Developmental Immunology.* 2012:967852.
- Martinez-Medina, M. A., Alvarez-Hernandez, G., Padilla-Zamudioa, J. G., Rojas-Guerra, M. G. (2007). Rocky Mountain spotted fever in children: clinical and epidemiological features. *Gac. Med. Mex.* 143:137–140. (Spanish).
- McLeod, M. P., Qin, X., Karpathy, S. E. (2004). Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae, *J Bacteriol*, vol. 186 (pg. 5842-55).
- McDade JE, Newhouse VF. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Ann Rev Microbiol* 1986; 40: 287-309.

- Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C., Raoult, D. (2014). Genotyping, Evolution and Epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infection, Genetics and Evolution*. 25:122-37.
- Merhej, V., Raoult, D. (2011). Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86:379–405.
- Merhej, V., Royer-Carenzi, M., Pontarotti, P., Raoult, D. (2009). Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria. *Biol. Direct*. 4:13.10.1186/1745-6150-4-13.
- Ogata, H., Renesto, P., Audic, S., Robert, C., Blanc, G., Fournier, P. E., Parinello, H., Claverie, J. M., Raoult, D. (2005). The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *PLoS Biol*. 3:e248.10.1371/journal.pbio.0030248.
- Parola, P., Labruna, M. B., Raoult, D. (2009). Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 11:40–50.
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdab, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 26:657-702.
- Raoult, D., Fournier, P.E., Ereemeeva, M., Graves, S., Kelly, P.J., Oteo, J.A., Sekeyova, Z., Tamura, A., Tarasevich, I., Zang, L. (2005). Naming of *Rickettsiae* and rickettsial diseases. *Annals New York Academy of Sciences*. 1063:1-12.
- Raoult, D., Parola, P. (2007) *Rickettsial Diseases*. New York: Informa Healthcare. p. 1-13, p. 15-26 y p. 315-330.
- Reed, S.C., Lamason, R.L., Risca, V.I., Abernathy, E., Welch, M.D. (2014). *Rickettsia* actinbased motility occurs in distinct phases mediated by different actin nucleators. *Current Biology*. 24:98-103.

- Renvoisé, A., Raoult, D. (2009). An update on rickettsiosis. *Médecine et maladies infectieuses*. 39:71-81.
- Rydkina, E., Silverman, D. J., Sahni, S. K. (2005). Similarities and differences in host cell signaling following infection with different *Rickettsia* species. *Ann NY Acad Sci*; 1063: 203-206.
- Sahni, S.K., Narra H.P., Sahni, A., Walker D.H. (2013). Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiology*. 8(10):1265-88.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 10:512–526.
- Tamura, K., P. D. Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Uchiyama, T. (2012). Tropism and pathogenicity of *rickettsiae*. *Frontiers in Microbiology*. 3:230.
- Walker, D, H. (2007). *Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45 Suppl 1, pp.S39–44.
- Walker, D. H. (2013). Los desafíos en el diagnóstico, la investigación y la concientización sobre las rickettsiosis en América Latina. *Acta Médica Costarricense*. 55:4-6.
- Xue-Jie y Walker, D. H. (2006). The Order Rickettsiales. *Prokaryotes*. 5:493-528.
- Yu, X. J., Walker, D. H. (2005). Genus I. *Rickettsia* da Rocha-Lima 1916. Edited by New York: Springer. In & S. J. T. Brenner D.J., Krieg, N.R., & Garrity, G.M., ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn., vol. 2 (The Proteobacteria). New York: Springer, pp. 96–106.

ANEXO

Llaves de acceso del banco de genes que se compararon con cada una de las muestras:

BMFJ34 – muestra 20, gen *gltA*: *Rickettsia rickettsii*: MH194350.1, *Rickettsia sp*: KY490997.1, LC456208.1, MG906678.1, MH177455.1 estudio basado en garrapata *Haemaphysalis longicornis*.

BMFJ35 - muestra 110, gen *gltA*: *Rickettsia sp*: KY490997.1, *Rickettsia rickettsii*: CP018914.1, CP018913.1, CP006010.1, CP006009.1.

BMFJ39- muestra 110, gen *ompA*: *Rickettsia rickettsii*: MN388788.1, MK350321.1, MK744157.1, MF678551.1, MF678550.1.

BMFJ40 – muestra 118, gen *ompA*: *Rickettsia rickettsii*: MN388788.1, MK350321.1, MK744157.1, MF678551.1, MF678550.1.

BMFJ43 - muestra 110, gen *17kDa*: *Rickettsia parkeri*: MK814827.1, MK814826.1, CP040325.1; *Rickettsia sp*: MN388800.1; *Rickettsia rickettsii*: MK744159.1.

BMFJ44 – muestra 118, gen *17kDa*: *Rickettsia parkeri*: MK814827.1, MK814826.1, CP040325.1; *Rickettsia sp*: MN388800.1; *Rickettsia rickettsii*: MK744159.1.