

LITERATURE REVIEW

Rickettsiosis

Rickettsiosis

Jorge Miranda R^{1*} M.Sc, Salim Mattar V¹ Ph.D, Marco Gonzalez T¹ M.Sc.

¹Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Investigaciones Biológicas del trópico, Montería, Córdoba, Colombia. *Correspondence: jorgemire@hotmail.com

Received: August 2016; Accepted: March 2017

ABSTRACT

Rickettsiosis are diseases considered neglected, poorly recognized, or confused with other pathologies in tropical and subtropical areas. In Colombia, despite having identified rickettsiosis endemic areas, few studies on the disease have been made, and there are very few works on public health vigilance. There are current efforts to understand the pathogenic molecular mechanisms on various species of rickettsia; however, breakthroughs are needed to have a better grasp of its epidemiology, and to develop quick, sensitive, and replicable diagnostic methods for those areas in which this zoonosis appears unpredictably.

keyword: Arthropod vectors, Rickettsia sp. Amblyomma, epidemiology (Source:CAB).

RESUMEN

Las rickettsiosis son consideradas enfermedades desatendidas, poco reconocidas o confundidas con otras patologías en las áreas tropicales y subtropicales. En Colombia, a pesar de tener identificadas zonas endémicas de rickettsiosis son pocos los estudios realizados sobre la enfermedad y son escasos los trabajos de vigilancia en salud pública. Actualmente se están realizando esfuerzos para entender los mecanismos moleculares patogénicos de las diferentes especies de rickettsia, sin embargo, grandes avances deben realizarse para comprender mejor la epidemiología y desarrollar métodos de diagnóstico rápidos, sensibles y reproducibles para aquellas zonas donde estas zoonosis aparecen de forma impredecible.

Palabras Clave: Vectores artrópodos, Rickettsia sp. Amblyomma, Epidemiología (Fuente: CAB).

INTRODUCTION

Rickettsias are obligate intracellular gram-negative, small-genome (1.1–1.5 Mb), bacteria that infect several types of cells in the arthropod host or in mammal endothelial cells (1,2). The largest physiopathological effect of a rickettsia infection consists of a small vessel vasculitis as a result of a direct infection of endothelial cells (3). Members of this genus have been classified into four groups: the typhus group (GT), which includes *R. prowazekii* transmitted by lice and causes epidemic typhus, and *Rickettsia typhi*, transmitted by fleas and causing endemic typhus; the Spotted fever group (GFM), which includes over 20 species, mostly transmitted by ticks (*Rickettsia rickettsii* in America, *Rickettsia conorii* in Europa, and *Rickettsia africae* in Africa). Other recently identified species such as *R. akari*, *R. felis*, and *R. australis*, sharing GFM and TG characteristics belong to the transitional group (GTR) (2,4). Several arthropods are efficient rickettsia vectors, reservoirs, or amplifiers, and their distribution and ecology affect the epidemiology of rickettsiosis. In Colombia, the presence of several vectors of rickettsia such as ticks of the complex *Amblyomma cajennense* (5) is renowned. Other vectors are *Rhipicephalus sanguineus*, or brown dog tick, and *Amblyomma ovale* or common dog tick (6). Domestic and wild animals are susceptible to infection of some sorts of rickettsia, some others serve as reservoirs or amplifiers in endemic areas. In humans, the severity of clinical symptoms vary depending on the rickettsia involved in the infection. *R. rickettsii* is the most lethal species for humans (7). Diagnosis of rickettsiosis is generally done by detecting antibodies with indirect immunofluorescence (gold standard). Molecular techniques, such as PCR and sequencing allow a quick and specific diagnosis (7,8).

Biological aspects of the agent. Rickettsias are obliged intracellular bacteria capable of infecting several types of cells in the arthropod host, as well as human endothelial cells. They are coccobacillus ranging from 0.7- 2.0 μm in length and 0.3- 0.5 μm wide; although some rickettsias may have a more elongated filament appearance (1). They have a triple layer cell wall typical of Gram negatives, consisting of an internal and external membrane separated from the peptidoglycan layer and surrounded by a glycocalyx or slime layer (1). Rickettsias have small genomes, between 1.1 and 1.5 Mb as a result of evolution by reduction (loss of genes). The content of G + C ranges between 33 and 29%. Different species have different optimum growth temperatures, but they generally range between 32 and 35°C (2). Rickettsias cannot be visualized with Gram stain, but with Giménez and Giemsa stains.

INTRODUCCIÓN

Las rickettsias son bacterias Gram negativas de genoma pequeño (1.1–1.5 Mb), intracelulares obligadas e infectan varios tipos de células; hospedero artrópodo y en células endoteliales de mamíferos (1,2). El mayor efecto fisiopatológico de la infección por rickettsia consiste en una vasculitis de pequeños vasos por infección directa en las células endoteliales (3). Los miembros del género han sido clasificados en varios grupos: grupo del tifus (GT) que incluye *R. prowazekii* transmitidos por piojos causante del tifus epidémico y *Rickettsia typhi* transmitido por pulgas y que causa el tifus endémico. El grupo de la fiebres manchadas (GFM) que incluye más de 20 especies la mayoría transmitidas por garrapatas (*Rickettsia rickettsii* en América, *Rickettsia conorii* en Europa y *Rickettsia africae* en África). Otras especies de reciente aparición como *R. bellii* y *R. canadensis* fueron ubicadas en el grupo ancestral (GA), y otras especies de como *R. akari*, *R. felis* y *R. australis* que comparten características de los GFM y TG pertenecen al grupo transicional (GTR) (2,4). Existen diferentes artrópodos eficientes como vectores, reservorios o amplificadores de las rickettsias y su distribución y ecología influyen la epidemiología de las rickettsiosis. En Colombia se conoce la presencia de varios vectores de *Rickettsia* como las garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense* (5). Otro de los vectores es *Rhipicephalus sanguineus* o garrapata marrón del perro y *Amblyomma ovale* garrapata común del perro (6). Animales domésticos y silvestres son susceptibles a la infección por algunas especies de *Rickettsia* algunos sirven como reservorios o amplificadores de rickettsia en áreas endémicas. En humanos, los síntomas clínicos varían en severidad dependiendo de la rickettsia involucrada en la infección. *R. rickettsii* es la especie más letal en humanos (7). El diagnóstico de infección por rickettsiosis se realiza generalmente mediante la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (prueba de oro) Las técnicas moleculares, como la PCR y la secuenciación, permiten un diagnóstico rápido y específico (7,8).

Aspectos biológicos del agente. Las rickettsias son bacterias intracelulares obligadas capaces de infectar varios tipos de células en su hospedero artrópodo y que infectan células endoteliales humanas. Son coccobacilos entre 0.7- 2.0 μm de longitud y de 0.3-0.5 μm de ancho; aunque algunas rickettsias pueden presentar una apariencia filamentosa más alargada (1). Poseen una pared celular trilaminar típica de un Gram negativo que consiste de una membrana interna y una externa separada de la capa de

Taxonomy. During the last decade, the taxonomy of rickettsiae has undergone wide reorganization. The Rickettsial order currently includes the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae*, most of whose members are associated with arthropod hosts, and the family *Holosporaceae*, symbiotic with protists. The traditional bacteriological methods used for identification cannot be applied to the study of rickettsias due to the intracellular nature of this microorganism. Molecular methods have been important for the advances of the taxonomy of these microorganisms (7,9).

Taxonomic molecular studies. Those related with the ribosomal gene 16S are not very useful due to the high homology present between species ($\geq 97\%$). Currently, in order to define genus, group, and species of rickettsia, sequencing five genes is necessary; 16S rRNA (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB*, and *sca4* (gene D) (10). According to the aforementioned criteria, in order to recognize and new species of rickettsia it must not show more than one of the following degrees of similarity with other species of validated rickettsia: ≥ 99.8 and $\geq 99.9\%$ for genes *rrs* and *gltA*, respectively. And ≥ 98.8 , ≥ 99.2 , and $\geq 99.3\%$ for *ompA*, *ompB* and gene D, respectively (10).

Other techniques such as PCR-RFLP, MST *Multi-Spacer Typing* and MLST *Multilocus sequence typing*, couples are being used to classify a species with good results; nonetheless, they are very elaborate and expensive techniques. Rickettsia experts do not fully agree on classification, and report that its taxonomy is still controversial and continuously evolving (11).

Pathogenic rickettsia groups. Initially, pathogenic members of the genus were divided into two groups by their antigenic characteristics: (i) the typhus group (GT) including species such as *R. prowazekii* (vectors are lice) and *Rickettsia typhi* (transmitted by fleas) and (ii) the spotted fever group (GFM) which includes over 20 species mostly transmitted by ticks and associated to infections throughout the world (*Rickettsia rickettsii* in America, *Rickettsia conorii* in Europa, and *Rickettsia africae* in Africa). Other pathogenic species of rickettsia such as *R. akari*, *R. felis*, and *R. australis* comprise the transitional group (GTR). Species of the ancestral group such as *R. bellii* and *R. Canadensis* do not have any known pathogenicity (2,4).

Transmission. Molecular studies demonstrate that rickettsias maintained their lifecycle by infecting a wide variety of hosts (9). Rickettsias are among those pathogens transmitted by a wide variety of arthropods such as lice, ticks, fleas, and mites (12) (Table 1).

peptidoglicano y rodeada por una de glicocalix o *slime* (1). Las rickettsias tienen genomas pequeños entre 1.1–1.5 Mb como resultado de la evolución por reducción (perdida de genes). El contenido de G+C varía entre 33 y 29%. Distintas especies tienen diferentes temperaturas óptimas de crecimiento, pero en general varían entre 32 y 35°C (2). Las rickettsias no se visualizan por la coloración de Gram, pero si con la coloración de Giménez y Giemsa.

Taxonomía. Durante la última década, la taxonomía de *Rickettsiae* ha sufrido una extensa reorganización. El orden *Rickettsiales* actualmente incluye las familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae*, la mayoría de los miembros asociados con huéspedes artrópodos y la familia *Holosporaceae*, simbioses de protistas. Los métodos tradicionales usados para identificación en bacteriología no pueden ser aplicados al estudio de las rickettsias debido a la naturaleza intracelular de este microorganismo. Los métodos moleculares han sido importantes para el avance de la taxonomía de estos microorganismos (7,9).

Estudios moleculares taxonómicos. Los relacionados con el gen ribosomal 16S no son muy útiles por la alta homología que se presenta entre las especies ($\geq 97\%$). Actualmente para definir género, grupo y especie de *Rickettsia*, es necesaria la secuenciación de cinco genes; 16S rRNA (*rrs*), *gltA*, *ompA*, *ompB* y *sca4* (gene D) (10). De acuerdo con los anteriores criterios, para que sea considerada una nueva especie de *Rickettsia*, no debe tener más de uno de los siguientes grados de similitud con las demás especies de rickettsia validadas: ≥ 99.8 y $\geq 99.9\%$ para los genes *rrs* y *gltA*, respectivamente. De ≥ 98.8 , ≥ 99.2 y $\geq 99.3\%$ para *ompA*, *ompB* y el gen D respectivamente (10).

Otras técnicas como PCR-RFLP, MST *Multi-Spacer Typing* y el MLST *Multilocus sequence typing*, también han sido usadas para la clasificación de las especies con buenos resultados; no obstante, son técnicas muy laboriosas y costosas. Expertos en *Rickettsia* no tienen un consenso general para la clasificación y reportan que su taxonomía sigue siendo controversial y en continua evolución (11).

Grupos patógenos de *Rickettsia*. Inicialmente, los miembros patógenos del género fueron divididos por sus características antigénicas en 2 grupos: (i) el grupo del tifus (GT) que incluye las especies *R. prowazekii* (vector piojo) y *Rickettsia typhi* (transmitido por pulgas) y (ii) el grupo de la fiebre manchada (GFM) que incluye más de 20 especies la mayoría transmitidas por garrapatas y asociadas a infecciones alrededor del mundo

Competent vectors of rickettsiosis transmission.

Several arthropods are efficient rickettsia vectors, reservoirs, or amplifiers, and their distribution and ecology affect the epidemiology of rickettsiosis. RMSF (Rocky Mountain Spotted Fever) cases in the United States (transmitted by *Dermacentor variabilis* and *D. andersoni*), as well as the Mediterranean Boutonneuse fever (transmitted by *Rhipicephalus sanguineus*) are more prevalent in late spring and summer, since these ticks are more active during these seasons (7). In contrast, tick activity in Colombia is constant and increases during the dry season between December and February. The most known vectors are summarized in table 1.

Main vectors of SFG rickettsiosis in Colombia.

Despite the large amount of information available in the country in regards to ticks, little is known about the vectors of rickettsiosis have been involved in the outbreaks.

In Colombia, we know about several species of the complex *Amblyomma cajennense* such as: *Amblyomma mixtum* and *Amblyomma patinoi* (Figure 1) In a large part of the Colombian territory (5,13).

(*Rickettsia rickettsii* en América, *Rickettsia conorii* en Europa y *Rickettsia africae* en África). Otras especies patógenas de rickettsias como *R. akari*, *R. felis* y *R. australis* del grupo transicional (GTR). Especies del grupo ancestral como *R. bellii* y *R. canadensis* no poseen patogenicidad conocida (2, 4).

Transmisión. Estudios moleculares demuestran que las rickettsias mantienen su ciclo vital al infectar una gran variedad de hospederos (9). Las rickettsias están entre los patógenos transmitidos por una amplia variedad de artrópodos como piojos, garrapatas, pulgas y ácaros (12) (Tabla 1).

Vectores competentes de transmisión de rickettsiosis.

Existen diferentes vectores artrópodos eficientes como reservorios o amplificadores de las rickettsias y su distribución y ecología influyen la epidemiología de las rickettsiosis. Los casos rickettsiosis de FMMR en Estados Unidos (transmitida por *Dermacentor variabilis* y *D. andersoni*) y la fiebre botonosa del mediterráneo en Europa (transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*) son más prevalentes a finales de la primavera y verano, debido a

Table 1. Arthropod vectors of rickettsiosis found in the Americas.

<i>Rickettsia</i> (geographical distribution)		
Rickettsiosis of Spotted Fever Group	Ticks potential vectors	Diseases name
<i>Rickettsia rickettsii</i> (Norte, centro y sur América)	<i>Dermacentor variabilis</i> <i>Dermacentor andersoni</i> <i>Amblyomma cajennense</i> s.l. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Amblyomma aureolatum</i>	Rocky Mountain spotted fever (USA) Fiebre de Tobia (Colombia) Febre Maculosa Brasileira (Brasil)
<i>Rickettsia parkeri</i> (EEUU, Brasil, Uruguay y Argentina).	<i>Amblyomma triste</i> <i>Amblyomma maculatum</i>	Infection by <i>Rickettsia parkeri</i>
<i>Rickettsia massiliae</i> (Argentina)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Infection by <i>Rickettsia massiliae</i>
<i>Rickettsia africae</i> (Islas del Caribe, Guadalupe)	<i>Amblyomma variegatum</i> <i>Amblyomma hebraeum</i>	African Tick Bite Fever
<i>Rickettsia amblyommii</i> (EEUU, Brasil, Argentina y Panamá)	<i>Amblyomma americanum</i>	Infection by <i>Rickettsia amblyommii</i>
Rickettsiosis of the Typhus group	Vectors and Potential	Diseases name
<i>Rickettsia prowazekii</i> (North, centro and South América).	<i>Pediculus humanus humanus</i> (human lice)	Epidemic Typhus
<i>Rickettsia typhi</i> (North, centro and South América).	<i>Xenopsylla cheopis</i> (Rat flea) <i>Ctenocephalides felis</i> (Rat flea)	Endemic Typhus
Rickettsiosis of transitional Group	Vectors and potential	Diseases name
<i>Rickettsia felis</i> (EEUU, Brasil, México y Uruguay)	<i>Ctenocephalides felis</i> (pulga del gato) <i>Xenopsylla cheopis</i> <i>Ctenocephalides canis</i>	Spotted fever Flea Transmitted
<i>Rickettsia akari</i> (EEUU, México y Costa Rica).	<i>Allodermanyssus sanguineus</i> <i>Liponyssoides sanguineus</i> (acaros)	Rickettsial pox



Figure 1. *Amblyomma cajennense sensu lato* (male) collected in Montería, department of Córdoba. Source: Research group of the Tropical Biological Research Institute, Universidad de Córdoba.

Another vector involved in the transmission of rickettsia commonly found in Colombia is *Rhipicephalus sanguineus*, or brown dog tick (Figure 2).



Figure 2. *Rhipicephalus sanguineus* (female) collected in Montería, department of Córdoba. Source: Research group of the Tropical Biological Research Institute, Universidad de Córdoba.

Amblyomma ovale (Figure 3) is a tick species hosted in dogs, recently involved in Brazil as a vector of rickettsias. It is commonly found in Colombia, therefore posing a significant risk for Rickettsia transmission (6).

A new species of SFG rickettsia was reported in the Department of Córdoba; this new species was named *Candidatus Rickettsia sp.*, Colombianensi strain, and it was detected in *Amblyomma dissimile* (14) (Figure 4), a species commonly found in reptiles (iguanas, snakes, and turtles).

Although more studies are needed to better characterize this new species of rickettsia, so far it is considered as a species with pathogenic potential

que estas garrapatas son más activas durante estas estaciones del año (7). En contraste, en el trópico colombiano la actividad de las garrapatas es constante y es mayor en la época seca entre diciembre y febrero. Los vectores más conocidos se resumen en la tabla 1.

Principales vectores de las Rickettsiosis del GFM en Colombia. A pesar de la gran información que se tiene en el país con referencias a las garrapatas, poco se conoce acerca de los vectores de las rickettsiosis que han estado involucrados en los brotes.

En Colombia se conoce de varias especies del complejo *Amblyomma cajennense* como: *Amblyomma mixtum* y *Amblyomma patinoi* (Figura 1) en gran parte del territorio colombiano (5,13).

Otro de los vectores involucrados en la transmisión de las rickettsias y que es común encontrar en Colombia es *Rhipicephalus sanguineus* o la garrapata marrón del perro (Figura 2).

Amblyomma ovale (Figura 3). Es una garrapata que tiene al perro como huésped más común, recientemente ha sido implicada en Brasil como vector de rickettsias. Es común encontrarla en Colombia lo que representa un riesgo potencial para la transmisión de rickettsias (6).

En el departamento de Córdoba se reportó la presencia de una nueva especie de rickettsia del GFM, la nueva especie se denominó *Candidatus Rickettsia sp.* cepa Colombianensi y fue detectada en *Amblyomma dissimile* (14) (Figura 4), especie encontrada comúnmente en reptiles (iguanas, serpientes y tortugas).

Aunque faltan estudios para caracterizar mejor esta nueva especie de rickettsia, hasta el momento se considera como una especie con potencial patógeno, ya que pertenece al GFM, grupo caracterizado porque la mayoría de sus especies son patógenas para el hombre. Otra razón para considerar potencialmente patógena a *Candidatus Rickettsia sp.*, cepa Colombianensi es que tiene una alta identidad genética 99% con *Rickettsia tamurae*, especie que pertenece al GFM y está asociada con enfermedad en humanos. Esta especie es reportada principalmente en Japón en *Amblyomma testudinarium* (15, 16). Sin embargo, la vigilancia de casos humanos de rickettsiosis en los sitios donde se describió esta nueva especie sería la mejor forma de establecer su patogenicidad.

Patogénesis. La patogenia de las rickettsias es similar entre ellas, las características moleculares



Figure 3. *Amblyomma ovale* (male) collected in the municipality of Los Córdoba, department of Córdoba. Source: Research group of the Tropical Biological Research Institute, Universidad de Córdoba.

since it belongs to the SFG group, characterized by having most of its species as pathogenic for humans. Another reason to consider *Candidatus Rickettsia* sp., Colombianensi strain as potentially pathogenic, is that it has a 99% genetic identity with *Rickettsia tamurae*, a species of the GFM group, and associated to human disease. This species is reported mainly in Japan in *Amblyomma testudinarium* (15, 16). However, vigilance of human rickettsiosis cases in the areas where this new species was described would be the best way to establish its pathogenicity.

Pathogenesis. Pathogenesis for all rickettsias is similar; molecular characteristics and gene expression contribute to the pathogenicity among different species of rickettsia. *Rickettsiae* expresses two major surface proteins called external membrane protein A (rOmpA) and B (rOmpB), both present in SFG rickettsias but rOmpB is found only in rickettsias of the GT group. They play an important role in cell adhesion and therefore are considered in the potential development of vaccines (17, 18). Studies performed on *R. conorii* demonstrated that the adhesion of rOmpB to Ku70 (receptor) and RickA protein result in a recruitment of the protein complex Arp2/3 (Arp: actin-related protein) which controls actin polymerization, resulting in rickettsia phagocytosis (19-21). Once inside the cytoplasm, rickettsia escapes from the phagocytic vacuole and enters the cytoplasm. The proteins involved in the liberation are phospholipases and hemolysins, phospholipase D (PLD) and others such as the B1 patatine precursor coded by the *pat1* gene, and two hemolysins coded by genes *tlyA* and *tlyC* (22-24).



Figure 4. *Amblyomma dissimile* (male) collected in the municipality of Montería, department of Córdoba. Source: Research group of the Tropical Biological Research Institute, Universidad de Córdoba.

y de expresión de genes contribuyen a la patogenicidad entre las diferentes especies de rickettsia. *Rickettsiae* expresa 2 proteínas mayores de superficie llamadas proteínas de membrana externa A (rOmpA) y B (rOmpB), ambas están presentes en las rickettsias del GFM pero solo rOmpB se encuentra en las rickettsias del GT. Estas juegan un papel importante en la adhesión a las células y por ello son consideradas para el desarrollo potencial de vacunas (17, 18). Estudios realizados en *R. conorii* demostraron que la adhesión de rOmpB a Ku70 (receptor) y la proteína RickA resultan en un reclutamiento del complejo proteico Arp2/3 (Arp: actin-related protein) que controla la polimerización de la actina, resultando en la fagocitosis de la rickettsias (19-21). Una vez dentro del citoplasma rickettsia escapa de la vacuola fagocítica y accede al citoplasma. Las proteínas involucradas en la liberación son fosfolipasas y hemolisinas, la fosfolipasa D (PLD) y otras como el precursor patatina B1 codificado por el gen *pat1* y dos hemolisinas codificadas por los genes *tlyA* y *tlyC* (22-24)

El mayor efecto fisiopatológico de la infección por rickettsia consiste en una vasculitis de pequeños vasos por infección directa en las células endoteliales. Esta vasculitis es debido al incremento de la permeabilidad vascular (producto de la ruptura de las uniones entre las células del endotelio), inflamación vascular generalizada, edema, incremento de la interacción entre leucocitos y endotelio y la liberación de mediadores vasoactivos que promueven la coagulación y la producción de citoquinas proinflamatorias (3).

The largest pathophysiological effect of rickettsia infections consists of a small vessel vasculitis due to a direct infection of endothelial cells. This vasculitis is due to an increase in vascular permeability (as a result of a rupture of the endothelial cell unions), generalized vascular swelling, edema, increase of the interaction between leukocytes and endothelium, and the release of vasoactive mediators that promote coagulation and the production of pro-inflammatory cytokines (3).

The important role of dendritic cells in innate and acquired immunity against rickettsia has been recently demonstrated. Early resistance to the infection is attributed to IFN production and natural killer cells, and the resulting activation of endothelial cells, dendritic cells, and macrophages. IFN and FNT are essential as a primary defense against *Rickettsia* infections (25).

Clinical manifestations in animals. As in humans, canines are susceptible to infection with some species of *Rickettsia*. Infected canines present fever, lethargy, vomit, depression, anorexia, petechia, ecchymosis, epistaxis, conjunctivitis, diarrhea, weight loss, and dehydration. As the infection progresses, additional signs may appear, including ocular lesions, blood disorders (anemia, thrombocytopenia, and mild leukopenia), joint pain, and neurologic abnormalities (paraparesis, or tetraparesis, ataxia, vestibular syndrome). They may also have a mild infection depending on the species of rickettsia (26).

Dogs play an important role as biological host of ticks and increase the population of infected ticks, which at some point could make close contact with human population and cause the disease (27). Dogs in endemic rickettsiosis areas act as sentinel animals in epidemiological studies (28). In 2008, Pinter et al. reported that dogs are important sentinels to detect the presence of *R. rickettsii* in areas where *A. aureolatum* ticks are the main vectors of the Brazilian spotted fever (29).

Little is known about the infection and the symptoms of rickettsia in other animals whether domestic (bovines) or wild.

Equines are the most studied domestic animals; studies indicate that when infected by *R. rickettsii*, they fail to display any clinical signs or hematological abnormalities. However, they do develop anti-rickettsia antibodies. Studies also conclude that equines are not good amplifiers of rickettsia, suggesting that they do not play our role as a natural amplifier of these microorganisms (30).

Recientemente se ha demostrado el papel de las células dendríticas importante en la inmunidad innata y adquirida contra rickettsia, La resistencia temprana a la infección es atribuida a la producción de IFN y por las células asesinas naturales y la resultante activación de las células endoteliales, las células dendríticas y macrófagos. El IFN y el FNT son esenciales como defensa primaria contra la infección por *Rickettsia* (25).

Manifestaciones clínicas en animales. Al igual que los humanos, los caninos son susceptibles a la infección por algunas especies de *Rickettsia*. Los caninos infectados presentan fiebre, letargia, vomito, depresión, anorexia, petequias, equimosis, epistaxis, conjuntivitis, diarrea, pérdida de peso y deshidratación. Como progreso de la infección se pueden desarrollar signos adicionales, incluyendo lesiones oculares, desordenes sanguíneos (anemia, trombocitopenia y ligera leucopenia), dolor en las articulaciones y anomalías neurológicas (paraparesis o tetraparesis, ataxia síndrome vestibular). A su vez pueden padecer una infección leve dependiendo de la especie de *Rickettsia* (26).

Los perros juegan un papel importante como anfitriones biológicos de las garrapatas y aumentan la población de las garrapatas infectadas que en algún momento pueden entrar en estrecho contacto con la población humana y causar la enfermedad (27). Los perros de las zonas endémicas de rickettsiosis actúan como animales centinelas en los estudios epidemiológicos (28). Pinter et al. en 2008, reportaron que los perros son importantes centinelas para detectar la presencia de *R. rickettsii* en las zonas donde la garrapata *A. aureolatum* es el principal vector de fiebre manchada brasileña (29).

Poco se conoce de la infección y de la sintomatología de rickettsia en otros animales tanto domésticos (Bovinos) como silvestres.

Entre los animales domésticos más estudiados están los equinos, los estudios indican que cuando son infectados por *R. rickettsii*, estos no muestran signos clínicos ni anomalías hematológicas, sin embargo, si desarrollan anticuerpos anti-rickettsiales. Otra conclusión de los estudios, es que los equinos no son buenos amplificadores de rickettsia, sugiriendo que no juegan papel como amplificación natural de estos microorganismos (30).

The wild animals studied include capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). It was demonstrated in Brazil that capybaras that underwent intraperitoneal inoculation of *R. rickettsii* displayed no symptoms of the disease, but did develop anti-rickettsia antibodies. They also demonstrated that capybaras developed high rickettsemia (12 days on average), capable of infecting ticks feeding on capybaras and guinea pigs inoculated with the blood of infected capybaras. In Colombia, capybaras have been studied as potential sentinels in rickettsiosis endemic areas (31).

Other studied animal species include small rodents such as *Microtus pennsylvanicus*, which has been implicated in the United States as one of the amplifiers for *R. rickettsii*. In Brazil, marsupials of the *Didelphis aurita* have also been implicated as competent amplifiers of *R. rickettsii* for *Amblyomma cajennense* ticks; however, other studies showed little or no amplification for *R. felis*, *R. bellii*, and *R. parkeri* species (32,33).

Future studies must address the role of domestic animals in good transmission dynamics of rickettsiosis, including the possibility of some animals to serve as reservoirs, amplifiers, or both (34).

Clinical manifestations in humans. Clinical symptoms of rickettsiosis are similar; however, their severity varies depending on the rickettsia involved in the infection. Currently, the Rocky Mountain spotted fever, caused by *R. rickettsii* is the most lethal rickettsiosis for humans in countries where it has been described. The main symptoms of rickettsiosis appear 6 to 14 days after the bite of the vector arthropod. Clinical manifestations include high fever, headache, muscle pain, nausea, vomiting, anorexia, abdominal pain, and diarrhea. Exanthema in the Rocky Mountain spotted fever is not usually apparent until the third day of fever, and begins with small irregular red macules that typically appear on the knees, elbows, and forearms. The exanthema can then evolve into wheals or petechiae. Complications include neurological manifestations, convulsions, and hemiplegia. Other manifestations of a severe disease include lung and kidney failure, myocarditis, the closest and gangrene in fingers, earlobes, and external genitalia (7).

DIAGNOSIS

Diagnosis of *R. rickettsii* infection in canines is generally done by detecting serum antibodies through indirect immunofluorescence, and a certain diagnosis requires sero-conversion or a fourfold elevation of antibody titers in paired samples. Alternatively, a sole titer above

Entre los animales silvestres estudiados se encuentran los capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). En Brasil se demostró que los capibaras inoculados intraperitonealmente con *R. rickettsii* no mostraron síntomas de enfermedad pero si desarrollaron anticuerpos anti-rickettsiales. También se demostró que los capibaras desarrollaron altas rickettsemias (12 días de duración en promedio) capaces de infectar a garrapatas alimentadas en los capibaras y a conejillos de indias inoculados con la sangre de los capibaras infectados. En Colombia los capibaras han sido estudiados como centinelas potenciales en áreas endémicas de Rickettsiosis (31).

Otras especies animales estudiadas son pequeños roedores como la especie *Microtus pennsylvanicus* que ha sido implicada en Estados Unidos como uno de los amplificadores de *R. rickettsii*. En Brasil, el marsupial de la especie *Didelphis aurita* también ha sido implicado como amplificador competente de *R. rickettsii* para la garrapata *Amblyomma cajennense*, sin embargo, en otros estudios mostró poca o ninguna amplificación para las especies *R. felis*, *R. bellii* y *R. parkeri* (32,33).

Los futuros estudios deben abordar el papel de los animales domésticos en la dinámica de la transmisión de las rickettsiosis, incluida la posibilidad de que algunos animales pueden servir como reservorios, amplificadores o ambos (34).

Manifestaciones clínicas en humanos. Los síntomas clínicos de las rickettsiosis son similares, sin embargo, varían en severidad dependiendo de la rickettsia involucrada en la infección. Actualmente la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, causada por *R. rickettsii* es la rickettsiosis con más alta letalidad en humanos en los diferentes países donde se ha descrito la enfermedad. Los principales síntomas de una rickettsiosis aparecen a los 6-14 días después de la picadura de artrópodo vector. Las manifestaciones clínicas, incluye fiebre alta, cefalea, mialgias, náuseas vómito, anorexia, dolor abdominal y diarrea. El exantema en la fiebre Manchada de las Montañas Rocosas no es usualmente aparente hasta el tercer día de fiebre y comienza con pequeñas máculas irregulares rojas que típicamente aparecen en las rodillas, codos y antebrazos. El exantema puede luego evolucionar a pápulas o petequias. Entre las complicaciones se presentan manifestaciones neurológicas, convulsiones y hemiplejía. Otras manifestaciones de una enfermedad severa incluyen falla pulmonar y renal, miocarditis, necrosis y gangrena de los dedos, lóbulos de las orejas y de los genitales externos (7).

1:1024 is also considered a diagnosis (35). However, this diagnostic method in canines is not usually used in Colombia and is reserved for research studies. Antibody detection with indirect immunofluorescence (IFI) is the gold standard and the best technique due to its sensitivity, specificity, and swiftness (8).

During the acute stage of rickettsiosis, immunohistochemical examination of biopsies taken from skin lesions is the most sensitive approximation to diagnosis. The drawbacks of this method are that it is not available in many laboratories and it cannot be applied until exanthema or an eschar appear, and that it does not differentiate the species involved in the infection.

Molecular techniques, such as the various methodologies of PCR and sequencing, allow for a quick and specific diagnosis by detecting rickettsia DNA in infected tissues, cultures, and ticks. The genes usually analyzed are those that code two external membrane proteins: rOmpA, rOmpB (7,36). The *gltA* gene is also used (Figure 5), which encode the citrate synthetase enzyme, present in all Rickettsias, the gene that codes the 17-kDa protein present in all SFG rickettsias, and gene D, found in most species. PCR should be the ideal diagnostic test; however it has some drawbacks such as the low sensitivity when the sample comes from animals that do not display highly rickettsemia, and the impossibility of obtaining isolation(8,37,38).

For diagnosis in humans, the most important epidemiological clinical finding is knowing about the exposure to ticks in endemic or high risk areas with vector population. At the early stage of the disease, symptoms are similar to many endemic tropical pathologies such as

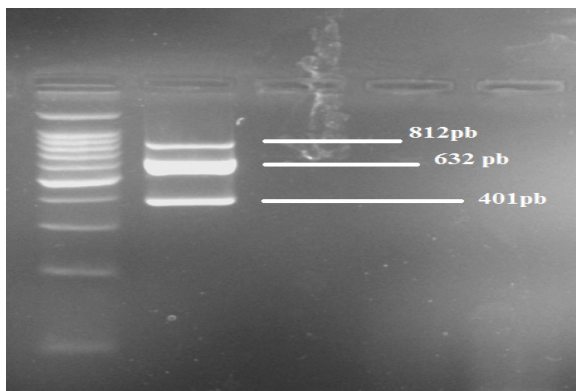


Figure 5. Amplification of genes rOmpA (632bp), rOmpB (812 bp) and *gltA* (401 bp). Source: Tropical Biological Research Institute – IIBT – Universidad de Córdoba.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de infección por *R. rickettsii* en caninos se realiza generalmente mediante detección de anticuerpos séricos por inmunofluorescencia indirecta, requiriéndose para un diagnóstico de certeza una seroconversión o elevación en cuatro veces de los títulos de anticuerpos en muestras pareadas. Alternativamente, un título único mayor de 1:1.024 también se considera diagnóstico (35). Sin embargo, este método de diagnóstico en caninos no suele ser usado en Colombia y solo se reserva para estudios de investigación. La detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI), es la prueba de oro y la mejor técnica por su sensibilidad especificidad y rapidez (8).

Durante la fase aguda de la rickettsiosis, la exanimación inmunohistoquímica de biopsias de lesiones cutáneas es la aproximación más sensible al diagnóstico. Este método tiene como desventaja que no está disponible para muchos laboratorios y no puede ser aplicado hasta la aparición de un exantema o escara y que no diferencia la especie involucrada en la infección.

Las técnicas moleculares, como la PCR en sus diversas metodologías y la secuenciación, permiten un diagnóstico rápido y específico al detectar ADN de rickettsia en tejidos infectados, cultivos y garrapatas. Los genes comúnmente analizados son los que codifican dos proteínas de la membrana externa: rOmpA, rOmpB (7,36). También se utiliza el gen *gltA* (Figura 5), que codifica la enzima citrato sintetasa presente en todas la rickettsias, el gen que codifica la proteína de 17-kDa presente en todas las rickettsias del GFM y el gen D presente en la mayoría de las especies. La PCR sería la prueba ideal para el diagnóstico, sin embargo, tiene algunas limitaciones como la baja sensibilidad cuando la muestra proviene de animales que no presentan altas rickettsemias y a la imposibilidad de obtener el aislamiento (8,37,38).

Para el diagnóstico en humanos, el hallazgo clínico epidemiológico más importante es conocer la exposición de garrapatas en zonas endémicas o de alto riesgo de población de vectores. Durante el comienzo de la enfermedad, los síntomas son parecidos a muchas otras patologías endémicas tropicales como: Dengue, Síndrome cardiopulmonar por Hantavirus, fiebres hemorrágicas por Arenavirus, Fiebre amarilla, Leptospirosis, Anaplasmosis, Ehrlichiosis y Malaria. Debido a esto hay que hacer un diagnóstico diferencial, situación complicada en el trópico colombiano, dada la endemia de algunos de esos patógenos. Debido a la similitud entre las patologías tropicales endémicas antes mencionadas, los análisis de

dengue, hantavirus cardiopulmonary syndrome, arenavirus hemorrhagic fever, yellow fever, leptospirosis, anaplasmosis, ehrlichiosis, and malaria. Thus the need for a differential diagnosis, and this is a complicated situation in the Colombian Tropic, given the endemic of some of these pathogens. Because of the similarities between the aforementioned endemic tropical pathologies, lab analysis are not very useful to diagnose rickettsiosis, and they usually show the same hematologic and biochemical abnormalities such as thrombocytopenia, and elevation of transaminase and VSG, hyponatremia and leukopenia (37, 39). The above-mentioned techniques are also used in human diagnosis.

Epidemiology, prevention, and control. Although rickettsias have a worldwide distribution, at least 13 species have been found in Central and South America, and most of the species classified as in the SFG(Figure 6) (40).

Studies in animals. Studies in domestic and wild animals determining rickettsia infections are

laboratorio son de poca utilidad en el diagnóstico de la rickettsiosis y frecuentemente muestran las mismas anomalías hematológicas y bioquímicas como: trombocitopenia, elevación de las transaminasas y VSG, hiponatremia y leucopenia (37,39). Para el diagnóstico en humanos se usan las mismas técnicas mencionadas anteriormente.

Epidemiología, prevención y control. Aunque las rickettsias tienen distribución mundial, en Centro y Suramérica, se han encontrado al menos 13 especies, la mayoría de estas especies clasificadas como en el GFM (Figura 6) (40).

Estudios en animales. Escasos son los estudios realizados en Colombia en animales domésticos y silvestres donde se determina la infección por rickettsias (31,34,41). Sin embargo, estos estudios son indispensables para entender mejor la dinámica de las rickettsiosis en una región determinada, en la tabla 2, se muestran los estudios publicados en el país.

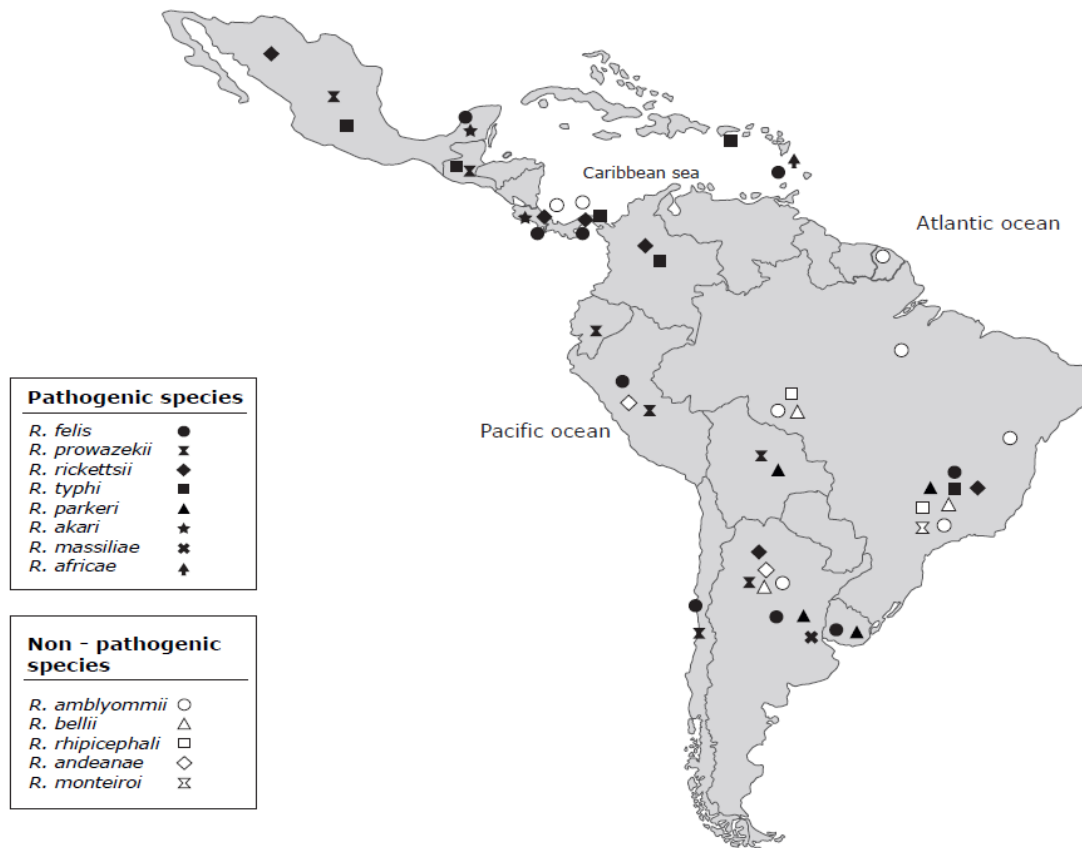


Figure 6. Geographic distribution of the 13 species of rickettsia found in Central and South America. Source: Labruna, M., Mattar, S., Nava, S., Bermudez, S., Venzal, J.M., Dolz, G et al. 2011, Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Rev.MVZ Córdoba 16, 2435-2457.

scarce (31,34,41). However, the studies are key for a better understanding of the dynamics of rickettsiosis in a specific region; Table 2 shows the studies published in the country.

Studies in humans. In Colombia, the first cases of the Tobia fever, as the Rocky Mountain spotted fever caused by *Rickettsia rickettsii* is known, were reported in 1934 and 1936 in the municipality of Tobia, in Cundinamarca, Colombia (42). During a period of 65 years, the disease was unseen by health entities, and only until 2001 a study of seroprevalence of *Rickettsia sp.* in fieldworkers of the rural area of the municipality of Ciénaga de Oro (Córdoba, Colombia) a high and concerning 49% prevalence was found in the analyzed subjects. The high seroprevalence found in the area demonstrated the circulation of our rickettsia of the spotted fever group (43). Consequently, more studies were made in the country and isolated cases and outbreaks of the disease appeared in various parts of the country, summarized in table 2.

Treatment. Doxycycline is the drug of choice for canines and humans. There are also some other drugs with proven efficiency such as tetracycline, oxytetracycline, and chloramphenicol. The recommendation for canines is 10 mg/kg of doxycycline once a day for 28 days. In most of the cases, those in the acute stage of the disease responded to doxycycline treatment within 24 to 72 hours after the first injection (66). For humans, the dosage is 100 mg/12 H for 3 to 7 days depending on the seriousness of the case. For endemic and murine typhus, a single dose of 100 mg/12h is enough. Children may also receive doxycycline and azithromycin (8,67,68).

There is no vaccine and against rickettsiosis. Contact with ticks must be avoided, and tick removal immediately after detection, avoiding exposure to tick infested habitats such as forests, bushes, and grasslands, and the use of pyrethroids are the best strategies to prevent the disease (68,69).

Estudios en humanos. En Colombia, los primeros casos de fiebre de Tobia como se le conoce a la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas causada por *Rickettsia rickettsii*, se reportaron en los años de 1934 y 1936, en la población de Tobia un municipio de Cundinamarca, Colombia (42). Durante un periodo de 65 años la enfermedad pasó desapercibida para las entidades de salud y no fue hasta el año 2001, en un estudio de seroprevalencia de *Rickettsia sp.* en trabajadores del campo en la zona rural del municipio de Ciénaga de Oro (Córdoba, Colombia), donde se encontró una alta y preocupante prevalencia del 49% en los sujetos analizados. La alta seroprevalencia encontrada en el área demostró la circulación de una rickettsia del grupo de las fiebres manchadas (43). Posteriormente más estudios se fueron realizando en país y casos aislados y brotes de la enfermedad fueron apareciendo en distintos lugares del país, resumen en la tabla 2.

Tratamiento. La doxiciclina es la droga de elección para los caninos y humanos. También existen otras drogas con comprobada eficacia como tetraciclina, oxitetraciclina, y cloranfenicol. Para caninos se recomiendan doxiciclina 10mg/kg una vez al día por 28 días. En la mayoría de los casos, los perros en fase aguda de la enfermedad responden al tratamiento con doxiciclina dentro de 24 a 72 horas posteriores a la primera administración (66). Para humanos, 100mg/12 h entre 3 a 7 días dependiendo la gravedad del caso. Para el tifus exantemático y murino una sola dosis de 100 mg/12h es suficiente. Los niños también pueden recibir doxiciclina y azitromicina (8,67,68).

No existe vacuna contra las rickettsiosis, se debe evitar el contacto con garrapatas y removerlas inmediatamente después de descubrirlas, prevenir la exposición a hábitats infestados de garrapatas como los bosques, matorrales y los pastos altos y usar repelentes con piretroides son las mejores estrategias para la prevención de la enfermedad (68, 69).

Table 2. Studies of *Rickettsia* in animals, ectoparasites and chronology of outbreaks, isolated cases and studies of seroprevalence of rickettsiosis in humans.

Studies of <i>Rickettsia</i> in animals				
Studies in animals Year	Nuber of animals studied	City/locality	Seroprevalence (%)	Reference
2009	22 (Dogs)	Cundinamarca/Villeta	18.2	Hidalgo et al 2009 (34)
2009	159 (Horses)	Cundinamarca/Villeta	16.3	Hidalgo et al 2009 (34)
2011	36 (Capybaras)	Córdoba/Montería	22	Miranda et al 2011 (31)
2013	354 (Rodents)	Antioquia/Apartadó, Turbo and Necoclí	43	Quintero et al 2013 (41)
Studies in Ectoparasites Year	Number of specimens studied	City/locality	Positives (%) Identified species	Reference
2009	3,169 Ticks	Córdoba/Montería, Los Cordobas	24.8% <i>Rickettsia</i> sp. cepa Colombianensi	Miranda et al 2012 (14)
2013	839 total 96 Ticks; 138 fleas; 168 lice 437 mites	Antioquia/ Apartadó, Turbo y Necoclí.	<i>Rickettsia</i> sp. Identity >99% with <i>R. tamurae</i> .	Quintero et al 2013 (41)
2009	1069 <i>Amblyomma cajennense</i>	Córdoba/Montería, Los Cordobas	<i>Rickettsia bellii</i> <i>Rickettsia</i> sp. strain Colombianensi	Miranda et al 2014 (44)
2010 -2011	1341 pulgas	Norte de Caldas	67 <i>R. felis</i>	Ramirez-Hernandez et al 2013 (45)
2010 - 2011	1318 pulgas	Caldas	30% <i>R. felis</i>	Eremeeva et al 2013 (46)
2010 - 2011	60 <i>Amblyomma ovale</i>	Antioquia/ Turbo y Necoclí.	20% <i>Rickettsia bellii</i> <i>Rickettsia</i> sp. Atlantic rainforest	Londoño et al 2014 (6)
2013	15 <i>Amblyomma patinoi</i>	Cundinamarca/Villeta y Naranjal	<i>R. rickettsii</i>	Faccini-Martínez et al 2015 (13)
Studies of Rickettsiosis in Humans				
Outbre				
Year	Cases number	City/locality	Mortality (%)	Reference
1934 - 1936	65	Cundinamarca/Tobia	95	Patiño et al 1934 (42)
2006	14	Antioquia/Necoclí	35	Acosta et al 2006 (47)
2005	14	Caldas/ Aguadas, Aranzazu, Filadelfia, Neira, Pacora and Salamina	0	Hidalgo et al 2008 (48)
2007	20	Córdoba/Los Córdoba	54	Hidalgo et al 2007 (49) Hidalgo et al 2011 (39)
2007	3	Valle del Cauca/El Cairo	0	Ramirez et al 2007 (50)
2008	15	Antioquia/Alto de Mulatos	26	Pacheco et al 2008 (51)
Report of cases				
Year	Cases number	City	Incidence (%)	Reference
2013	1	Cundinamarca/Útica	-	Faccini et al 2013 (52)
2010 -2011	9	Caldas	34	Hidalgo et al 2013 (53)
2014	1	Cali	-	Patiño-Niño et al 2015 (54)
2013	10	Quindío	6,8	Rodríguez-Salazar et al 2016 (55)
2015	1	Meta/Puerto Gaitán	-	Gómez-Quintero et al 2016 (56)
Seroprevalence studies				
Year	Number people studied	City/locality	Seroprevalence (%)	Reference
2000 - 2004	160	Cundinamarca	21	Hidalgo et al. 2007 (57)
2001	100	Córdoba/Ciénaga de Oro	49	Miranda et al. 2001 (43)
2001 - 2004	64	Guaviare	4.7	Suarez et al. 2008 (58)
2004	90	Sucre/ varios municipios	7.8	Ríos et al. 2008 (59)
2005	371	Cundinamarca/Villeta	40.3	Hidalgo et al. 2007 (60)
2009	642	Antioquia/Necoclí	29	Padmanabha et. al. 2008 (61)
2007 - 2008	220	Antioquia/ Turbo,Necoclí and Apartado	2,7	Arroyave et. al. 2013 (62)
2010 - 2011	682	Caldas	18 <i>R. felis</i> ; 25 <i>R. typhi</i>	Hidalgo et al. 2013 (53)
2011	32	Meta/Puerto López	59	Miranda et al. 2011 (63)
2012	190	Córdoba/Tuchín	5,2	Barrera et al 2015 (64)
2012-2013	338	Cesar y Guajira	21	Ortiz et al. 2015 (65)
2013	220	Antioquia/ Turbo y Necoclí	24	Quintero et al. 2013 (41)

REFERENCIAS

1. Philip RN, Casper EA, Anacker RL, Cory J, Hayes SF, Burgdorfer W, et al. *Rickettsia bellii* sp. nov.: a Tick-Borne Rickettsia, Widely Distributed in the United States, That Is Distinct from the Spotted Fever and Typhus Biogroups. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1983 January 1, 1983;33(1):94-106.
2. Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 May;1166:1-11.
3. Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nat Rev Microbiol*. 2008 May;6(5):375-86.
4. Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, et al. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One*. 2007;2(3):e266.
5. Rivera-Paez FA, Labruna MB, Martins TF, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): First record confirmation in Colombia using morphological and molecular analyses. *Ticks and tick-borne diseases*. 2016 Jul;7(5):842-8.
6. Londono AF, Diaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M, et al. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks and tick-borne diseases*. 2014 Oct;5(6):672-5.
7. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin Microbiol Rev*. 2005 October 1, 2005;18(4):719-56.
8. Ramón Blanco J, Jado I, Marín M, Sanfeliu I, Portillo A, Anda P, et al. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: Anaplasma, Bartonella, Rickettsia, Tropheryma whipplei. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008;26(9):573-80.
9. Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E. The emerging diversity of Rickettsia. *Proc Biol Sci*. 2006 Sep 7;273(1598):2097-106.
10. Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5456-65.
11. Parola P, Labruna MB, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. *Curr Infect Dis Rep*. 2009 Jan;11(1):40-50.
12. Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biological Reviews*. 2010:no-no.
13. Faccini-Martinez AA, Costa FB, Hayama-Ueno TE, Ramirez-Hernandez A, Cortes-Vecino JA, Labruna MB, et al. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* ticks, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2015 Mar;21(3):537-9.
14. Miranda J, Portillo A, Oteo JA, Mattar S. *Rickettsia* sp. Strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): A New Proposed Rickettsia Detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) From Iguanas and Free-Living Larvae Ticks From Vegetation. *Journal of Medical Entomology*. 2012;49(4):960-5.
15. Imaoka K, Kaneko S, Tabara K, Kusatake K, Morita E. The First Human Case of *Rickettsia tamurae* Infection in Japan. *Case reports in dermatology*. 2011;3(1):68-73.
16. Fournier PE, Takada N, Fujita H, Raoult D. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2006 Jul;56(Pt 7):1673-5.
17. Sumner JW, Sims KG, Jones DC, Anderson BE. Protection of guinea-pigs from experimental Rocky Mountain spotted fever by immunization with baculovirus-expressed *Rickettsia rickettsii* rOmpA protein. *Vaccine*. 1995 Jan;13(1):29-35.
18. Valbuena G, Feng HM, Walker DH. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes Infect*. 2002 May;4(6):625-33.

19. Martinez JJ, Cossart P. Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. *J Cell Sci.* 2004 Oct 1;117(Pt 21):5097-106.
20. Walker DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15;45 Suppl 1:S39-44.
21. Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F, et al. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature.* 2004 Jan 29;427(6973):457-61.
22. Silverman DJ, Santucci LA, Meyers N, Sekeyova Z. Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. *Infect Immun.* 1992 Jul;60(7):2733-40.
23. Walker DH, Feng HM, Popov VL. Rickettsial phospholipase A2 as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Dec;65(6):936-42.
24. Whitworth T, Popov VL, Yu XJ, Walker DH, Bouyer DH. Expression of the *Rickettsia prowazekii* pld or tlyC gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediates phagosomal escape. *Infect Immun.* 2005 Oct;73(10):6668-73.
25. Feng HM, Walker DH. Mechanisms of intracellular killing of *Rickettsia conorii* in infected human endothelial cells, hepatocytes, and macrophages. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6729-36.
26. Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in parasitology.* 2010 Apr;26(4):205-12.
27. Solano-Gallego L, Kidd L, Trotta M, Di Marco M, Caldin M, Furlanello T, et al. Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerg Infect Dis.* 2006 Dec;12(12):1985-8.
28. Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CV, Figueira FC, Labruna MB, et al. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cadernos de saude publica.* 2006 Mar;22(3):495-501.
29. Pinter A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cadernos de saude publica.* 2008;24:247-52.
30. Ueno TE, Costa FB, Moraes-Filho J, Agostinho WC, Fernandes WR, Labruna MB. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. *Parasites & vectors.* 2016;9:499.
31. Miranda J, Contreras V, Negrete Y, Labruna MB, Mattar S. Surveillance of *Rickettsia* sp. infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) a potential model of epidemiological alert in endemic areas. *Biomedica.* 2011 Jun;31(2):216-21.
32. Horta MC, Moraes-Filho J, Casagrande RA, Saito TB, Rosa SC, Ogrzewalska M, et al. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector borne and zoonotic diseases.* 2009 Feb;9(1):109-18.
33. Horta MC, Sabatini GS, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Canal RB, Pacheco RC, et al. Experimental infection of the opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. *Vector borne and zoonotic diseases.* 2010 Dec;10(10):959-67.
34. Hidalgo M, Vesga JF, Lizarazo D, Valbuena G. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Jun;80(6):1029-30.
35. Gasser AM, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB. Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 2001 Jan-Feb;37(1):41-8.
36. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol.* 1998 Jul;48 Pt 3:839-49.
37. Walker DH, Paddock CD, Dumler JS. Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. *Medical Clinics of North America.* 2008;92(6):1345-61.

38. Sexton DJ, Kanj SS, Wilson K, Corey GR, Hegarty BC, Levy MG, et al. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Jan;50(1):59-63.
39. Hidalgo M, Miranda J, Heredia D, Zambrano P, Vesga JF, Lizarazo D, et al. Outbreak of Rocky Mountain spotted fever in Cordoba, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Feb;106(1):117-8.
40. Labruna M, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *RevMVZ Córdoba.* 2011;16(2):2435-57.
41. Quintero J, Londoño A, Díaz F, Agudelo-Flórez P, Arboleda M, Rodas J. Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia. *Biomedica.* 2013;33.
42. Patino L, Afanador A, Paul JH. A spotted fever in Tobia, Colombia. 1937. *Biomedica.* 2006 Jun;26(2):178-93.
43. Miranda A, Florez S, S M. Alta seroprevalencia de rickettsiosis en trabajadores del campo en el municipio de Ciénaga de Oro, Cordoba. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2001;7(5):71-5.
44. Miranda J, Mattar S. Molecular detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia* sp. strain Colombianensi in ticks from Cordoba, Colombia. *Ticks and tick-borne diseases.* 2014 Mar;5(2):208-12.
45. Ramirez-Hernandez A, Montoya V, Martinez A, Perez JE, Mercado M, de la Ossa A, et al. Molecular detection of *Rickettsia felis* in different flea species from Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Sep;89(3):453-9.
46. Resúmenes de ponencias. *Acta Médica Costarricense.* 2013;55:63-96.
47. Acosta J, Urquijo L, Díaz A, Sepúlveda M, Mantilla G, Heredia D, et al. Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero - marzo de 2006. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2006;11(12):177-92.
48. Hidalgo M, Salguero E, de la Ossa A, Sanchez R, Vesga JF, Orejuela L, et al. Murine typhus in Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Feb;78(2):321-2.
49. Hidalgo M, Lizarazo DS, Ovalle MV, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, et al. Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2007;12(24):367 - 78.
50. Ramírez NE, Galvis Murillo O, Agudelo AF, Velásquez R, Restrepo Rendón LF, Castrillón Valencia NK, et al. Tifus murino en el Cauca-Valle ¿brote o condición endémica emergente? *Investigaciones Andina.* 2007;9:5-13.
51. Pacheco O, Giraldo MR, Duran MM, Hidalgo M, Echeverri I, Rodríguez LE, et al. Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2008;13(10):145 - 60.
52. Faccini-Martinez AA, Forero-Becerra EG, Cortes-Vecino JA, Polo-Teran LJ, Jacome JH, Vargas JJ, et al. Probable case of flea-borne spotted fever (*Rickettsia felis*). *Biomedica.* 2013 Sep;33 Suppl 1:9-13.
53. Hidalgo M, Montoya V, Martinez A, Mercado M, De la Ossa A, Velez C, et al. Flea-borne rickettsioses in the north of Caldas province, Colombia. *Vector borne and zoonotic diseases.* 2013 May;13(5):289-94.
54. Patiño-Niño JA, Pérez-Camacho PM, Aguirre-Recalde JA, Faccini-Martínez AA, Montenegro-Herrera CA, Hidalgo M. Caso probable de tifus murino con falla ventilatoria en una adolescente del área urbana de Cali, Colombia. *Infectio.* 2016;20:97-100.
55. Rodríguez-Salazar CA, Recalde-Reyes DP, González MM, Padilla Sanabria L, Quintero-Álvarez L, Gallego-Gómez JC, et al. Manifestaciones clínicas y hallazgos de laboratorio de una serie de casos febriles agudos con diagnóstico presuntivo de infección por el virus dengue. Quindío (Colombia). *Infectio.* 2016;20:84-92.
56. Gomez-Quintero CH, Faccini-Martinez AA, Botero-Garcia CA, Lozano M, Sanchez-Lerma L, Miranda J, et al. Probable case of spotted fever group rickettsial infection in a new suspected endemic area, Colombia. *Journal of infection and public health.* 2016 Sep 7.
57. Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, et al. Rocky Mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jul;13(7):1058-60.

58. Suárez R, Hidalgo M, Niño N, González C, Vesga JF, Orejuela L, et al. Las rickettsias como agentes etiológicos de entidades febriles no diagnosticadas en Colombia. 2008.
59. Ríos R, Franco S, Mattar S, Urrea M, Tique V. Seroprevalence of *Leptospira* sp., *Rickettsia* sp. and *Ehrlichia* sp. in rural workers of Sucre, Colombia. *Infect*. 2008;12(2):318 - 23.
60. Hidalgo M, Sanchez R, Orejuela L, Hernandez J, Walker DH, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group rickettsiae in a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Aug;77(2):378-80.
61. Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castaneda E, Galeano A, Puerta H, et al. Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial and leptospiral exposure in Colombia. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2009 Oct;9(5):483-90.
62. Arroyave E, Londono AF, Quintero JC, Agudelo-Florez P, Arboleda M, Diaz FJ, et al. Etiology and epidemiological characterization of non-malarial febrile syndrome in three municipalities of Uraba (Antioquia), Colombia. *Biomedica*. 2013 Sep;33 Suppl 1:99-107.
63. Miranda J, Sánchez L, Amaya K, Mattar S. Primera prueba serológica de *Rickettsia* sp. del grupo de la fiebre manchada en el departamento del Meta. *Biomedica*. 2011;31(Suplemento):105.
64. Barrera S, Martínez S, Tique-Salleg V, Miranda J, Guzmán C, Mattar S. Seroprevalencia de Hantavirus, *Rickettsia* y Chikungunya en población indígena del municipio de Tuchín, Córdoba. *Infectio*. 2015;19:75-82.
65. Ortiz J, Miranda J, Ortiz L, Navarro Y, Mattar S. Seroprevalencia de *Rickettsia* sp. en indígenas Wayuü de la Guajira y Kankuamos del Cesar, Colombia. *Infectio*. 2015;19:18-23.
66. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2002 May-Jun;16(3):309-15.
67. Masters EJ, Olson GS, Weiner SJ, Paddock CD. Rocky Mountain spotted fever: a clinician's dilemma. *Arch Intern Med*. 2003 Apr 14;163(7):769-74.
68. Chapman AS, Bakken JS, Folk SM, Paddock CD, Bloch KC, Krusell A, et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep*. 2006 Mar 31;55(RR-4):1-27.
69. Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. *MMWR Recomm Rep*. 2016;65(2):1-44.