



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

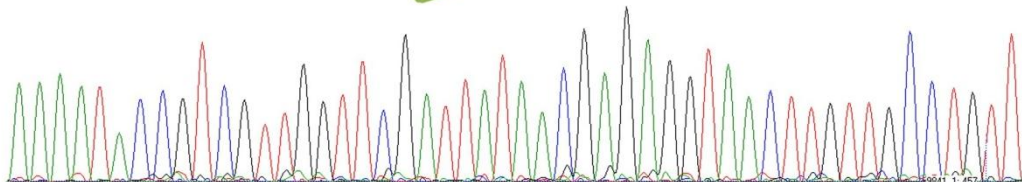
Título
Rendimiento de diferentes métodos de PCR en el diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas transmitidas por garrapatas
Autor/es
Sonia Santibáñez Sáenz
Director/es
José Antonio Oteo Revuelta y Aránzazu Portillo Barrio
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



Rendimiento de diferentes métodos de PCR en el diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas transmitidas por garrapatas, tesis doctoral de Sonia Santibáñez Sáenz, dirigida por José Antonio Oteo Revuelta y Aránzazu Portillo Barrio (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2014
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

RENDIMIENTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PCR EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS RICKETTSIOSIS HUMANAS TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS



Tesis doctoral

**Sonia Santibáñez Sáenz
2012**



TESIS DOCTORAL

**Rendimiento de diferentes métodos de PCR en
el diagnóstico molecular de las rickettsiosis
humanas transmitidas por garrapatas**

Memoria presentada para aspirar al título de Doctor por
La Universidad de La Rioja

Sonia Santibáñez Sáenz

2012



Don José Antonio Oteo Revuelta, Doctor en Medicina y Cirugía, y Jefe del Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro - Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Doña Aránzazu Portillo Barrio, Doctora en Ciencias Biológicas, y Responsable del Laboratorio de Patógenos Especiales del Área de Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Por la presente declaran que:

La memoria titulada “**Rendimiento de diferentes métodos de PCR en el diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas transmitidas por garrapatas**”, que presenta Dña. Sonia Santibáñez Sáenz, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) bajo su dirección y reúne las condiciones específicas para optar al grado de Doctor.

Lo que hacen constar en Logroño, a 26 de junio de 2012

Fdo.: Dr. José A. Oteo Revuelta

Fdo.: Dra. Aránzazu Portillo Barrio

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores de Tesis, al Dr. José Antonio Oteo y a la Dra. Arantza Portillo, por su ejemplo, ánimo y dedicación. Por el día a día. Por haberme acogido en su equipo hace ya 9 años, por haberme formado. Es todo un honor trabajar con vosotros.

A mis compañeras del Área de Enfermedades Infecciosas. A Paula, por su ayuda constante y por su apoyo incondicional. Sin ella no hubiera podido terminar este trabajo. A Ana, por su continua disposición. Gracias por facilitar siempre las cosas, y por vuestra dedicación en esta Memoria. A Lara, por su apoyo. A Lourdes, Emma, Laura y Patricia.

Quisiera dar las gracias de forma especial a Valvanera. Sus conocimientos y experiencia forman parte de este trabajo.

A José Ramón, por su interés y su ánimo. A Begoña, Luis y Merche.

Quisiera también dar las gracias a Nico. A Yoli, Bea, María, Nerea y Marcos, por estar siempre dispuestos a ayudar.

A Elisa Palomar, por colaborar en la edición de esta Memoria.

Me gustaría dar las gracias de todo corazón a mi familia. Por su comprensión y su ayuda inestimable. A mi abuela, a mi tía y a Marián, por estar siempre pendientes de mí. Por su ánimo. A Jorge y a Antonio, por su cariño.

A Josu, Carmentxu, María Luisa, Gorka y Virginia.

A mi madre, por estar siempre ahí, por su ejemplo constante de valentía y superación. Por su ayuda permanente. A Paula, para la que no hay suficientes líneas para agradecerle lo que cada día hace por mí. A Isabel, por su apoyo, por su comprensión. Sin ellas todo sería mucho más difícil.

A Íñigo, por su ilusión, por estar a mi lado, por entenderme y por quererme. Gracias a ti, a esa perseverancia y tenacidad que me has “contagiado”, has hecho un poco más fácil llevar a buen término esta Tesis.

A Daniel y a Álvaro, porque a través de sus ojos todo gana, o pierde, sentido. Por sus sonrisas, que me hacen a mi sonreír. Gracias por haberme permitido “robaros” ese tiempo que he necesitado para terminar esta Memoria.

Por último, quería dar las gracias a mi padre. Él siempre me apoyó y me animó cuando estuvo a mi lado, y lo ha seguido haciendo aunque ya no esté conmigo. Sé que hubiera estado muy orgulloso.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
TABLAS	v
<i>Introducción</i>	3
1. GARRAPATAS	5
2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS	8
3. RICKETTSIOSIS	16
3.1. Características microbiológicas del género <i>Rickettsia</i>	16
3.2. Taxonomía	19
3.2.1. Posición taxonómica del género <i>Rickettsia</i>	19
3.2.2. División en grupos	21
3.2.3. Identificación de especies	22
3.2.3.1. Técnicas serológicas	22
3.2.3.2. Análisis de proteínas	22
3.2.3.3. Técnicas de biología molecular	23
3.3. Rickettsias implicadas en patología humana	29
3.4. Principales rickettsiosis presentes en Europa	34
3.4.1. Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas	34
3.4.1.1. Fiebre exantemática mediterránea o fiebre botonosa ..	34
3.4.1.2. Fiebre manchada de Israel	36
3.4.1.3. DEBONEL/TIBOLA	37
3.4.1.4. LAR	38
3.4.1.5. Infección por <i>R. helvetica</i>	39
3.4.1.6. Infección por <i>R. aeschlimannii</i>	40
3.4.1.7. Infección por <i>R. monacensis</i>	41

3.4.1.8. Infección por <i>R. felis</i>	42
3.4.1.9. Infección por <i>R. massiliae</i>	43
3.4.1.10. Fiebre africana por picadura de garrapata	44
3.4.2. Rickettsiosis del grupo tifus	45
3.4.2.1. Tifus murino	46
3.4.3. Situación en España.....	47
3.5. Diagnóstico de las rickettsiosis	51
3.5.1. Técnicas diagnósticas directas	52
3.5.1.1. Cultivo	52
3.5.1.2. Observación directa	54
3.5.1.3. Técnicas de biología molecular	55
3.5.2. Técnicas diagnósticas indirectas: Métodos serológicos	59
<i>Objetivos</i>	65
<i>Material y Métodos</i>	
1. Muestras estudiadas	69
2. Preparación de las muestras	70
2.1. Centrifugación de la sangre.....	70
2.2. Preparación de las biopsias	70
2.3. Retirada e identificación de las garrapatas.....	70
2.4. Extracción del ADN.....	72
2.5. Cuantificación del ADN.....	74
2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	74
2.7. Electroforesis en gel de agarosa	81
2.8. Secuenciación y análisis de los resultados positivos	82
2.9. Incorporación de secuencias a la base de datos GenBank	82

Resultados

1. Detección de <i>Rickettsia</i> spp. en las muestras.....	85
2. Sensibilidad de los métodos de PCR empleados.....	89
2.1. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. en las muestras clínicas de pacientes sintomáticos.....	89
2.1.1. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. empleando dos métodos de PCR.....	91
2.1.1 A. Métodos de PCR simples	91
2.1.1 B. Reacciones de PCR secuenciales	92
2.1.2. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. empleando tres métodos de PCR.....	93
2.1.2 A. Combinación de tres métodos de PCR simples	93
2.1.2 B. Combinación de un método de PCR secuencial con un método de PCR simple	94
2.1.2.B-1. Reacción de PCR semianidada del gen <i>ompA</i> combinada con una reacción de PCR simple.....	94
2.1.2.B-2. Reacción de PCR anidada del gen <i>gltA</i> combinada con una reacción de PCR simple	95
2.1.2.B-3. Reacción de PCR anidada del gen <i>ompB</i> combinada con una reacción de PCR simple	96
2.1.3. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. empleando cuatro métodos de PCR	96
2.1.3 A. Combinación de cuatro reacciones de PCR simples...	96
2.1.3 B. Combinación de un método de PCR secuencial con dos métodos de PCR simples.....	97
2.1.3.B-1. Reacción de PCR semianidada del gen <i>ompA</i>	

combinada con dos métodos de PCR simple	98
2.1.3.B-2. Reacción de PCR anidada del gen <i>gltA</i>	
combinada con dos métodos de PCR simple	98
2.1.3.B-3. Reacción de PCR anidada del gen <i>ompB</i>	
combinada con dos métodos de PCR simple	99
2.1.3 C. Combinación de dos reacciones de PCR secuenciales .	100
2.1.4. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. empleando	
cinco métodos de PCR.....	101
2.1.4.A. Combinación de cinco reacciones de PCR simples	101
2.1.4.B. Combinación de un método de PCR secuencial con	
tres métodos de PCR simples	101
2.1.4.B-1. Reacción de PCR semianidada del gen <i>ompA</i>	
combinada con tres métodos de PCR simples	101
2.1.4.B-2. Reacción de PCR anidada del gen <i>gltA</i>	
combinada con tres métodos de PCR simples	102
2.1.4.B-3. Reacción de PCR anidada del gen <i>ompB</i>	
combinada con tres métodos de PCR simples	103
2.1.4.C. Combinación de dos métodos de PCR secuenciales	
con las reacciones de PCR simples	104
2.1.5. Amplificaciones de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. empleando	
seis métodos de PCR	105
2.1.5.A. Combinación de seis reacciones de PCR simples	105
2.1.5.B. Combinación de un método de PCR secuencial con	
cuatro métodos de PCR simples	105
2.1.5.B-1. Reacción de PCR semianidada del gen <i>ompA</i>	
combinada con cuatro métodos de PCR simples...	105
2.1.5.B-2. Reacción de PCR anidada del gen <i>gltA</i>	

combinada con cuatro métodos de PCR simples	106
2.1.5.B-3. Reacción de PCR anidada del gen <i>ompB</i>	
combinada con cuatro métodos de PCR simples..	106
2.1.5.C. Combinación de las tres reacciones de PCR	
secuenciales.....	107
2.1.6. Detección de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. en las muestras	107
2.1.6.A. Fluidos y biopsias	107
2.1.6.B. Artrópodos	112
2.2. Amplificación de ADN de <i>Rickettsia</i> spp. en las garrapatas	
de pacientes asintomáticos.....	114
3. Utilidad para la identificación de especies de los diferentes	
métodos de PCR analizados.....	116
3.1. Muestras clínicas de pacientes sintomáticos	116
3.1.1. Síndromes	135
3.2. Garrapatas de pacientes asintomáticos.....	162
4. Secuencias de <i>Rickettsia</i> spp. introducidas en GenBank	168
4.1. Secuencia nucleotídica de <i>R. slovacica</i> (gen ARNr 16S).....	168
4.2. Secuencia nucleotídica de <i>R. slovacica</i> (gen <i>htrA</i>).....	169
4.3. Secuencia nucleotídica de una bacteria no cultivada DER	
204 (gen ARNr 16S).....	171
4.4. Secuencia nucleotídica de <i>Candidatus R. rioja</i> (gen <i>glA</i>).....	173
4.5. Secuencia nucleotídica de <i>Candidatus R. rioja</i> (gen <i>ompB</i>)...	175
4.6. Secuencia nucleotídica de <i>Candidatus R. rioja</i> (gen <i>ompA</i>)...	177

<i>Discusión</i>	181
<i>Conclusiones</i>	201
<i>Referencias Bibliográficas</i>	205
<i>Anexo</i>	239

ABREVIATURAS

µg/mL	Microgramo/mililitro
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
CIBIR	Centro de I nvestigación B iomédica de La R ioja
D.O.	D ensidad ó ptica
DEBONEL	Linfadenopatía, eritema y necrosis transmitida por <i>Demacentor</i> (<i>Demacentor-Borne- Necrosis Erythema Lymphadenopathy</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ESCAR	Grupo de estudio para <i>Coxiella</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Anaplasma</i> y <i>Bartonella</i> de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas
ETG	Enfermedad transmitida por g arrapatas
FB	Fiebre b otonosa
FMMR	Fiebre m anchada de las m ontañas r ocosas
GFM	Grupo de las fiebres m anchadas
GT	Grupo t ifus

kDa	Kilodalton
LAR	Linfangitis asociada a rickettsiosis
Mb	Megabase
mg/mL	Miligramo/mililitro
MIF	Microinmunofluorescencia
min.	Minutos
mM	Milimolar
n°	Número
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
P3	Laboratorio de nivel de bioseguridad 3
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pmol	Picomoles
pmol/μL	Picomoles/microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
sca	Antígeno celular de superficie (surface cell antigen)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio-dodecil-sulfato
seg.	Segundos

SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SPA	Proteínas antigénicas de superficie (Surface protein antigen)
subsp.	Subespecie
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tifus exantemático o epidémico
TIBOLA	Linfoadenopatía transmitida por garrapatas (Tick borne lymphadenopathy)
TM	Tifus murino o endémico
VSG	Velocidad de sedimentación glomerular

TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de las garrapatas.

Tabla 2. Principales diferencias entre *Ixodidae* y *Argasidae*.

Tabla 3. Enfermedades protozoarias transmitidas por garrapatas.

Tabla 4. Enfermedades víricas transmitidas por garrapatas.

Tabla 5. Enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas.

Tabla 6. Posición taxonómica del género *Rickettsia*.

Tabla 7. Clasificación en grupos de las diferentes especies de rickettsia de acuerdo al análisis filogenético de los genes ARNr 16S, *gltA*, *ompA* y *ompB*.

Tabla 8. Especies de rickettsia en estado *Candidatus* que aparecen en el NCBI (mayo 2012).

Tabla 9. *Rickettsia* spp. implicadas en patología humana.

Tabla 10. Rickettsiosis diagnosticadas en España.

Tabla 11. Especies de rickettsias identificadas en artrópodos en España.

Tabla 12. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR empleados para la identificación molecular de garrapatas mediante la detección del gen ARNr 16S.

Tabla 13. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR empleados para la identificación molecular de garrapatas del género *Rhipicephalus* mediante la detección del gen ARNr 12S mitocondrial.

Tabla 14. Componentes de una reacción de PCR, concentración y volumen de cada uno de ellos.

Tabla 15. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen ARNr 16S para la detección de *Rickettsia* sp.

Tabla 16. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen *ompA*.

- Tabla 17.** Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación del gen *gltA*.
- Tabla 18.** Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen *ompB*.
- Tabla 19.** Secuencia de los cebadores y condiciones de la reacción de PCR para el gen *htrA*.
- Tabla 20.** Detección de *Rickettsia* spp. en muestras de pacientes.
- Tabla 21.** Número y porcentaje (en orden creciente) de muestras clínicas de pacientes sintomáticos en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. empleando diferentes métodos de PCR.
- Tabla 22.** Número y porcentaje de muestras clínicas (en orden creciente) en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. combinando dos reacciones de PCR simples
- Tabla 23.** Número y porcentaje de muestras (en orden creciente) en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar tres reacciones de PCR simples.
- Tabla 24.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. combinando la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* con cada una de las reacciones de PCR simples.
- Tabla 25.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. combinando la reacción de PCR anidada del gen *gltA* con cada una de las reacciones de PCR simples.
- Tabla 26.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. mediante la combinación de la reacción de PCR anidada del gen *ompB* con las reacciones de PCR simples.
- Tabla 27.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar cuatro reacciones de PCR simples.

- Tabla 28.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR semianidada del gen *ompA* y dos reacciones de PCR simples.
- Tabla 29.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *gltA* y dos reacciones de PCR simples.
- Tabla 30.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *ompB* y dos reacciones de PCR simples.
- Tabla 31.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar cinco reacciones de PCR simples.
- Tabla 32.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR semianidada del gen *ompA* y tres reacciones de PCR simples.
- Tabla 33.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *gltA* y tres de las reacciones de PCR simples.
- Tabla 34.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *ompB* y tres reacciones de PCR simples.
- Tabla 35.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR semianidada del gen *ompA* y cuatro reacciones de PCR simples.
- Tabla 36.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *gltA* y cuatro reacciones de PCR simples.
- Tabla 37.** Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *ompB* y cuatro reacciones de PCR simples.

- Tabla 38.** Porcentajes de detección de ADN de *Rickettsia* spp. en fluidos y biopsias.
- Tabla 39.** Número de artrópodos (en orden creciente) retirados de pacientes en los que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. empleando diferentes métodos de PCR.
- Tabla 40.** Número de artrópodos de pacientes asintomáticos en los que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. empleando diferentes métodos de PCR.
- Tabla 41.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 16 sangres completas con EDTA.
- Tabla 42.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 12 muestras de capa eritrocitaria.
- Tabla 43.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 4 muestras de capa leucocitaria.
- Tabla 44.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 2 muestras de plasma.
- Tabla 45.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 biopsias.
- Tabla 46.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 8 muestra de suero.
- Tabla 47.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%.) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 24 *D. marginatus* retirados de pacientes con rickettsiosis.
- Tabla 48.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 *R. sanguineus* retirados de pacientes con rickettsiosis.

- Tabla 49.** Síndromes y especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos con cada uno de los métodos de PCR en las muestras de los 52 pacientes.
- Tabla 50.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 4 *D. marginatus* de pacientes asintomáticos.
- Tabla 51.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 8 *H. marginatum* retirados de pacientes asintomáticos.
- Tabla 52.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 *R. sanguineus* retirados de pacientes asintomáticos.
- Tabla 53.** Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 *R. bursa* retirados de pacientes asintomáticos.

INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis, y en general, las enfermedades transmitidas por artrópodos vectores, han sido a lo largo de la historia una amenaza para el hombre. Esta amenaza aún continúa y en la actualidad estas enfermedades son un claro ejemplo de enfermedades emergentes y re-emergentes.

El tifus exantemático (*Rickettsia prowazekii*), transmitido por piojos, es una de las enfermedades infecciosas que mayor número de muertes ha provocado a lo largo de la historia de la humanidad. Así, durante la primera guerra mundial se produjeron más de 30 millones de casos, que ocasionaron la muerte de 3 millones de personas. En la actualidad, son las rickettsiosis transmitidas por garrapatas las que tienen gran importancia dado su elevado impacto en salud pública.

Hasta hace poco tiempo, en Europa la única rickettsiosis transmitida por garrapatas era la Fiebre botonosa (FB) o exantemática mediterránea (*Rickettsia conorii*). En los últimos años, gracias a la observación de las diferencias epidemiológicas y al desarrollo de las técnicas de biología molecular y de cultivo celular, se han descrito nuevas rickettsiosis en Europa como el DEBONEL/TIBOLA (Linfadenopatía, eritema y necrosis transmitida por *Dermacentor*/Linfadenopatía transmitida por garrapatas) o las diferentes infecciones por *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia massiliae*, o *Rickettsia africae* en turistas que regresan de zonas endémicas.

El diagnóstico de las rickettsiosis se basa en la sospecha clínica, presencia de fiebre y/o escara y/o exantema tras el antecedente de picadura de garrapata, o ambiente epidemiológico de contacto con artrópodos vectores. Estos signos no siempre están presentes o son débiles, y son necesarias pruebas confirmatorias de laboratorio. El cultivo de estos microorganismos en líneas celulares permitiría un diagnóstico definitivo, pero es un método lento, muy laborioso y, además, queda restringido a laboratorios de alto nivel de bioseguridad (P3).

Los métodos más utilizados para el diagnóstico microbiológico de las rickettsiosis son las técnicas serológicas y, entre ellas, la microinmunofluorescencia (MIF). Si bien esta técnica es la más utilizada, presenta una serie de inconvenientes:

- Gran número de reacciones cruzadas entre diferentes especies de rickettsia, e incluso con otros géneros bacterianos

- Subjetividad a la hora de interpretar los resultados
- Necesidad de un segundo suero en fase de convalecencia para estudiar una seroconversión o un serorrefuerzo, o lo que es lo mismo, falta de sensibilidad en las fases precoces de la infección.

En los últimos años la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación de varios fragmentos de diferentes genes rickettsiales han permitido un diagnóstico rápido de estas infecciones, a la vez que han permitido implicar nuevas especies de rickettsia en diferentes cuadros clínicos. Estas técnicas no están estandarizadas ni comercializadas.

El Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro-Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), lleva más de 20 años dedicándose al estudio de las rickettsiosis y en general, de las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG). Desde 2002, el Área de Enfermedades Infecciosas cuenta con un laboratorio de Patógenos Especiales en el que se ponen a punto y se estudia la rentabilidad de estas técnicas. En el laboratorio se encuentran almacenadas las muestras de pacientes con ETG que, a lo largo de estos años, han sido remitidas a nuestro centro.

Hasta este momento, en la literatura no se conoce cuál de los diferentes ensayos de PCR disponibles para el diagnóstico de estas infecciones, son los que mostraban una mayor rentabilidad. Por ello nos planteamos el siguiente trabajo a fin de poder determinar la sensibilidad y la especificidad para la identificación de especies de los diferentes métodos de PCR empleados en el diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas.

1. GARRAPATAS

Las garrapatas son ectoparásitos (artrópodos) hematófagos presentes en todo el mundo, que parasitan diferentes especies de mamíferos (incluido el hombre), aves y reptiles.

Estos artrópodos tienen gran importancia epidemiológica y clínica, ya que se han convertido en los principales vectores de enfermedades infecciosas en los países industrializados. A nivel mundial sólo son superados, en su capacidad vectorial, por los mosquitos (Oteo, 1995; Parola and Raoult, 2001). Además, tienen gran importancia desde el punto de vista veterinario, dadas las graves pérdidas económicas que pueden ocasionar como consecuencia de las alteraciones en la salud que provocan en el ganado doméstico (Oteo, 1995).

Existen dos grandes familias de garrapatas: *Ixodidae* o garrapatas duras, denominadas así por su armazón quitinoso (actualmente se conocen 692 especies), que son las más importantes desde el punto de vista médico; *Argasidae* o garrapatas blandas (se conocen 186 especies). Existe una tercera familia, *Nuttalliellidae*, representada por una sola especie (*Nuttalliella namaqua*), que se encuentra confinada en el Sudeste de África y que carece de interés sanitario.

Las garrapatas, en su ciclo vital presentan tres fases evolutivas: larva, ninfa y adulto (macho y hembra) (Figura 1). En cada una de estas tres fases necesitan ingerir una mínima cantidad de sangre para continuar su desarrollo. El hombre puede ser atacado por cualquiera de estos estadios y sufrir alguno de los procesos infecciosos, tóxicos o irritativos y alérgicos que son capaces de producir.

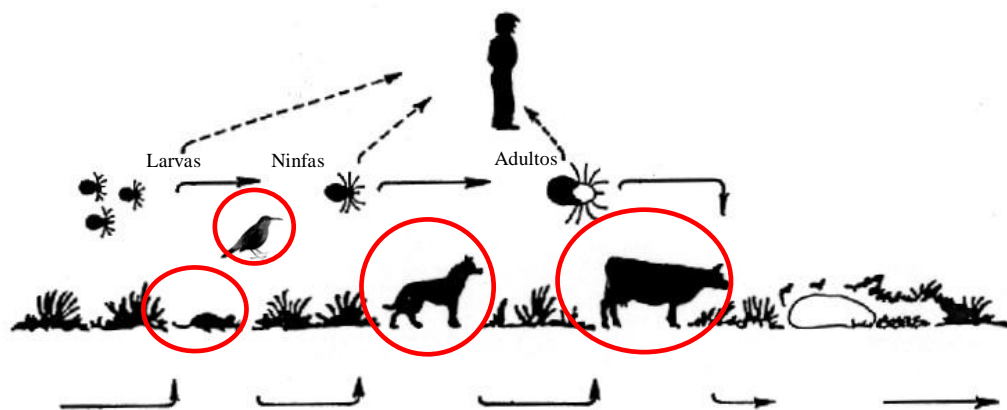


Figura 1. Ciclo vital de las garrapatas (familia *Ixodidae*).

En la siguiente tabla se puede ver la clasificación taxonómica de las garrapatas (modificada a partir de Nava *et al.*, 2009).

Tabla 1. Taxonomía de las garrapatas.

Phylum	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Chelicerata</i>
Clase	<i>Arachnida</i>
Subclase	<i>Acari</i>
Orden	<i>Parasitiformes</i>
Suborden	<i>Ixodida</i>
Superfamilia	<i>Ixodoidea</i>

Familias:

1.- Ixodidae

Grupo: Prostriata

Subfamilia: *Ixodinae*

Género: *Ixodes*

Grupo: Metastriata:

Subfamilia: *Bothriocrotoninae*

Género: *Bothriocroton*

Subfamilia: *Amblyomminae*

Género: *Amblyomma*

Subfamilia: *Haemaphysalinae*

Género: *Haemaphysalis*

Subfamilia: *Rhipicephalinae*

Género: *Anomalohimalaya*

Cosmiomma

Dermacentor

Hyalomma

Margaropus

Nosomma

Rhipicentor

Rhipicephalus

2.- Argasidae

Subfamilia: *Argasinae*

Género: *Argas*

Subfamilia: *Ornithodorinae*

Géneros: *Ornithodoros*

Otobius

Antricola

Nothoaspis

3.- Nuttalliellidae

Género: *Nuttalliella*

Las dos grandes familias de garrapatas, *Ixodidae* y *Argasidae*, presentan claras diferencias entre sí, tanto en su aspecto morfológico como en su ciclo vital, tal y como se expone en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales diferencias entre *Ixodidae* y *Argasidae*.

	Características	Familia	
		<i>Ixodidae</i>	<i>Argasidae</i>
Morfología	Escudo dorsal	Presente	Ausente
	Capítulo	Visible dorsalmente	No visible dorsalmente
	Placas espiraculares	Grandes Detrás de la coxa IV	Diminutas Delante de la coxa IV
	Glándulas coxales	Ausentes	Presentes (adultos y ninfas)
	Dimorfismo sexual	Bien definido	Poco definido
Ecología	Hábitats	Mayoritariamente exófilas	Mayoritariamente endófilas
	Actividad estacional	Sí	No
	Estrategias en la búsqueda del hospedador	Búsqueda pasiva (Trepan a la vegetación) Búsqueda activa Espera en sus hábitats	Espera en sus hábitats
	Número de hospedadores en su ciclo	De 1 a 3	Múltiples
	Duración del ciclo vital	6 meses a 6 años	Prolongado (puede ser > 10 años)
Biología	Oviposición	1 sola puesta 5.000 huevos/puesta	Varias puestas 500 huevos/puesta
	Fases ninfales	1	Varias (hasta 10)
	Alimentación	1/estadio Lenta (2–15 días)	Varias/estadio Rápida (15–30 minutos)
	Engorde	Elevado	Menor
	Osmorregulación	Glándulas salivares	Fluido coxal

*Endófilas: Desarrollo en espacios cerrados/ Exófilas: Desarrollo en espacios abiertos

2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS

Las garrapatas pueden provocar enfermedad mediante diferentes mecanismos patogénicos. Así, pueden causar reacciones inflamatorias locales, reacciones alérgicas de gravedad variable y parálisis neurotóxica (Gauci *et al.*, 1989; Dworkin *et al.*, 1999). No obstante, su mayor interés radica en su capacidad de actuar como vectores y/o reservorios de una gran variedad de microorganismos patógenos tanto para el ser humano como para los animales.

Aunque posiblemente la primera referencia de una ETG fue la plaga de babesiosis “epizootia” que asoló el ganado vacuno en tiempos del faraón Ramsés II (Éxodo 9: 3), estos artrópodos no han sido incriminados como vectores de enfermedades infecciosas hasta finales del siglo XIX. En 1893, Smith y Kilbourne demostraron que *Boophilus annulatus* transmitía *Babesia bigemina*, agente causal de la fiebre de Texas en el ganado vacuno (Oteo, 1995). Pocos años más tarde, se las incriminó en la transmisión de enfermedades infecciosas al hombre. Así, en 1906, Howard Ricketts demostró que *Dermacentor andersoni* estaba implicada en la transmisión de *Rickettsia rickettsii*, microorganismo responsable de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) (Ricketts, 1906; Ricketts, 1909). En los años siguientes se describieron nuevas enfermedades y se identificaron sus agentes etiológicos y sus vectores (Conor and Bruch, 1910). En la década de 1980 se consiguió el aislamiento y la identificación de *Borrelia burgdorferi*, agente causal de la borreliosis de Lyme (Burgdorfer, 1982), considerada en la actualidad como la enfermedad transmitida por vectores más importante en Europa y en Estados Unidos. Sin duda, ha sido a partir de esta fecha cuando el interés por estos artrópodos y las enfermedades que transmiten han cobrado una mayor relevancia. Así, en los últimos años, se han descrito y se siguen describiendo numerosas enfermedades bacterianas, víricas y protozoarias transmitidas por garrapatas (Tablas 3-5).

Tabla 3. Enfermedades protozoarias transmitidas por garrapatas.

Enfermedad	Agente etiológico	Vector principal	Distribución
Babesiosis	<i>Babesia divergens</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
	<i>Babesia microti</i>	<i>Ixodes scapularis</i>	América

Tabla 4. Enfermedades víricas transmitidas por garrapatas.

Enfermedad	Agente etiológico	Vector principal	Distribución
Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo	Virus de la Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (Género <i>Nairovirus</i>)	<i>Amblyomma variegatum</i> <i>Hyalomma marginatum</i>	África
		<i>H. marginatum</i>	Europa, Asia
Fiebre de Colorado transmitida por garrapatas	Virus de la Fiebre de Colorado (Género <i>Coltivirus</i>)	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor reticulatus</i>	América
Encefalitis transmitida por garrapatas	Diferentes virus del género <i>Flavivirus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
		<i>Dermacentor silvarum</i>	Antigua URSS, Mongolia
		<i>Ixodes persulcatus</i>	Antigua URSS, Japón
Fiebre Hemorrágica de Omsk	Virus de la Fiebre hemorrágica de Omsk (Género <i>Flavivirus</i>)	<i>D. reticulatus</i> <i>I. persulcatus</i>	Antigua URSS, Japón
Enfermedad de los bosques de Kyasanur	Virus de la Enfermedad de los bosques de Kyasanur (Género <i>Flavivirus</i>)	<i>Haemaphysalis spinigera</i>	India, Sri Lanka

Tabla 5. Enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas.

Enfermedad	Agente etiológico	Vector principal	Distribución
Fiebre botonosa	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	Complejo <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Área mediterránea
Fiebre exantemática de Israel	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	<i>R. sanguineus</i>	Israel, Portugal, Italia
Fiebre de Astracán	<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	<i>Rhipicephalus pumilio</i> <i>R. sanguineus</i>	Astracán, Kosovo, Chad
Tifus por garrapatas de India	<i>Rickettsia conorii indica</i>	<i>R. sanguineus</i> <i>Boophilus microplus</i> <i>Haemaphysalis leachii</i>	India, Pakistán
Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Amblyomma aureolatum</i> <i>Amblyomma canjennense</i> <i>R. sanguineus</i>	Continente Americano (excepto Canadá y Alaska)
Linfangitis asociada a Rickettsiosis (LAR)	<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolitimona</i>	<i>Hyaloma asiaticum</i> <i>Hyaloma truncatum</i> <i>Hyaloma anatolicum excavatum</i> <i>Rhipicephalus pussillus</i>	Sur Europa, África

Enfermedad	Agente etiológico	Vector principal	Distribución
Tifus por garrapatas del norte de Asia	<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	<i>Dermacentor nuttalli</i> <i>Dermacentor marginatus</i> <i>Dermacentor silvarum</i> <i>Dermacentor pictus</i> <i>Dermacentor sinicus</i> <i>Dermacentor auratus</i> <i>Haemaphysalis concinna</i>	Siberia, Mongolia
Tifus por garrapatas de Queensland	<i>Rickettsia australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> <i>Ixodes tasmani</i> <i>Ixodes cornuatus</i>	Australia
Fiebre exantemática de las islas Flinders	<i>Rickettsia honei</i>	<i>Amblyomma hydrosauri</i> <i>Ixodes granulatus</i>	Australia, Tailandia (cepa TT-118), Nepal
Fiebre exantemática australiana	<i>Rickettsia marmionii</i>	<i>Haemaphysalis novaeguinae</i> <i>Ixodes holocyclus</i>	Australia
Fiebre africana por picadura de garrapata	<i>Rickettsia africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> <i>Amblyomma variegatum</i>	África Subsahariana, Guadalupe, Turquía, Oceanía
Fiebre exantemática japonesa	<i>Rickettsia japonica</i>	<i>Haemaphysalis flava</i> <i>Haemaphysalis hystericis</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i> <i>Dermacentor taiwanensis</i> <i>Ixodes ovatus</i>	Japón, Tailandia

Enfermedad	Agente etiológico	Vector principal	Distribución
Rickettsiosis transmitida por garrapatas del lejano este	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	<i>D. silvarum</i> <i>Haemaphysalis concinna</i> <i>Haemaphysalis japonica douglasi</i>	Antigua URSS, China, Japón
Innominada	<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa, Asia central
Innominada	<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>Hyalomma. marginatum</i>	Área mediterránea, África
Innominada	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>A. maculatum (triste)</i> <i>Amblyomma americanum</i>	Continente Americano (excepto Canadá y Alaska)
Innominada	<i>Rickettsia monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Europa
Innominada	<i>Rickettsia massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i> <i>Rhipicephalus turanicus</i>	Área mediterránea, Continente Americano (excepto Canadá y Alaska)
Linfiadenopatía, eritema y necrosis trnsmitida por <i>Dermacentor</i> / Linfadenopatía por picadura de garrapata (DEBONEL/TIBOLA)	<i>Rickettsia slovacae</i> <i>Candidatus Rickettsia rioja</i> <i>Rickettsia raoultii</i>	<i>D. marginatus</i> <i>Dermacentor reticulatus</i>	Europa
Borreliosis de Lyme	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>I. ricinus</i>	Europa
		<i>Ixodes scapularis</i> <i>Ixodes pacificus</i>	América
		<i>Ixodes persulcatus</i>	Asia

Enfermedad	Agente etiológico	Vector principal	Distribución
Ehrliquiosis monocítica humana	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>A. americanum</i>	América
Anaplasmosis humana	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>I. ricinus</i>	Europa
		<i>I. pacificus</i>	América
Ehrliquiosis granulocítica humana	<i>Ehrlichia ewingii</i>	<i>A. americanum</i>	América
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>	Diversos	América, Europa, Asia

Las garrapatas adquieren los microorganismos fundamentalmente de tres formas: 1. Al alimentarse sobre animales infectados, 2. Por transmisión transestadial (transmisión de la infección al siguiente estadio en el ciclo evolutivo), 3. Por transmisión transovárica (de la hembra infectada a la siguiente generación) (Parola and Raoult, 2001). Además, existen otras formas excepcionales de adquirir la infección: una garrapata infectada puede transmitir la infección a otra cuando ambas se alimentan muy próximas, sin necesidad de que se produzca la infección del hospedador, lo que se conoce como fenómeno del co-feeding (Richter *et al.*, 2002a) y por último se ha descrito la transmisión sexual de algunas bacterias (ciertas especies de rickettsias y de borrelias) del macho infectado a la hembra (Raoult and Roux, 1997).

Rickettsia spp. y *Babesia* spp. se multiplican en todos los órganos de la garrapata, incluidos ovarios y glándulas salivares. De esta forma es posible la transmisión transestadial y transovárica, y el artrópodo actúa como vector y como reservorio de la enfermedad. Otros microorganismos no se multiplican en los ovarios y la garrapata actúa únicamente como vector. Por último, algunos microorganismos no se multiplican en las glándulas salivares, de modo que la garrapata no puede transmitirlos durante el proceso de alimentación. Sin embargo, si estos microorganismos se eliminan por las heces, es posible su transmisión a través de excoriaciones de la piel. Así, se han aislado algunas especies del género *Rickettsia*, como *Rickettsia slovacica*, viables en las heces de *Dermacentor marginatus* recogidos de la vegetación (Parola *et al.*, 2005).

Las garrapatas transmiten los distintos agentes patógenos al hombre y a los animales a través de la saliva, de los fluidos coxales, del contenido intestinal regurgitado y/o de las heces.

La distribución geográfica y la incidencia de las diferentes ETG dependen de numerosos factores. Para que aparezca una determinada enfermedad en una zona concreta es necesaria la presencia en esa zona de la garrapata que actúa como vector y/o reservorio. Como se ha comentado en el capítulo anterior, la actividad y la supervivencia de estos artrópodos dependen tanto de la presencia de hospedadores como de la existencia de una serie de condiciones medioambientales particulares para cada especie. La incidencia de estas

enfermedades es variable a lo largo de las épocas del año y se correlaciona con los periodos de máxima actividad de sus vectores. Además, la incidencia está directamente relacionada con la prevalencia de la infección en las garrapatas y en los hospedadores (cuando las garrapatas no actúan como reservorios). Otros factores importantes son la afinidad de cada especie de garrapata por picar al hombre y la frecuencia con la que éste entra en contacto con el hábitat del artrópodo. Por último, la aparición de las ETG depende de la susceptibilidad individual de cada persona tras la picadura (Parola and Raoult, 2001; Oteo, 1995).

En España existe una amplia variedad de garrapatas duras entre las que se incluyen al menos 28 especies correspondientes a los géneros *Ixodes* (9 especies), *Rhipicephalus* (5 especies, incluido el subgénero *Boophilus*), *Dermacentor* (2 especies), *Hyalomma* (7 especies) y *Haemaphysalis* (5 especies) [Estrada, 1994; Marquez *et al.*, 2005; Estrada, 2011 (comunicación personal)]. Estos artrópodos son responsables de la transmisión de distintas enfermedades al hombre. La FB y la borreliosis de Lyme son las más frecuentes, pero se han descrito también otras, como el DEBONEL/TIBOLA, tularemia, babesiosis, anaplasmosis humana y parálisis neurotóxica.

3. RICKETTSIOSIS

Las rickettsiosis constituyen un grupo heterogéneo de zoonosis, transmitidas por artrópodos vectores (garrapatas, piojos, pulgas y otros ácaros) y producidas por distintas especies del género *Rickettsia*.

Las rickettsias son bacterias intracelulares obligadas, que se mantienen en la naturaleza en un ciclo que abarca distintos mamíferos, que actúan como reservorios, y distintos artrópodos, que actúan como vectores y, en muchas ocasiones, también como reservorios. El hombre es un huésped accidental en este ciclo, ya que no propaga los microorganismos en la naturaleza. La única excepción a esta regla la constituye el tifus exantemático o epidémico (TE). En esta zoonosis el ser humano actúa como principal reservorio de la enfermedad (Saah, 2002).

Las rickettsiosis, tradicionalmente, se han dividido en dos grupos: el grupo de las fiebres manchadas (GFM) y el grupo tifus (GT). Esta división está basada en diferencias antigénicas, patogénicas, clínicas y epidemiológicas.

3.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Rickettsia*

Las rickettsias son pequeños cocobacilos, Gram negativos, pleomórficos (0,3-0,61 µm de diámetro por 0,2-2 µm de longitud) e inmóviles, que viven libres en el citoplasma de las células que infectan. Se dividen lentamente por fisión binaria (8-10 horas). Se tiñen mal con el método de Gram, pero pueden ser observadas con las tinciones de Giemsa (color púrpura rojizo), Giménez o Machiavello (color rojo brillante). Estos microorganismos están rodeados por una cápsula mal caracterizada, rica en polisacáridos. La pared celular tiene un aspecto ultraestructural similar al de las bacterias Gram negativas y contiene peptidoglucano y una capa de lipopolisacáridos. Las rickettsias están rodeadas por una capa proteica cristalina conocida como S-layer. Esta capa representa del 10 al 15% del total de la masa proteica de las rickettsias, y está compuesta por proteínas antigénicas inmunodominantes de superficie (SPA, "Surface Protein Antigens"). Dos de estas SPA, rOmpA y rOmpB son los principales determinantes antigénicos involucrados en la respuesta inmune en pacientes con rickettsiosis. Son proteínas

de gran tamaño, de 2.000 y 1.600 aminoácidos y un peso molecular de 170-190 kDa y 135 kDa, respectivamente. Estas proteínas juegan un importante papel en la adhesión de las rickettsias a las células que infectan (Li and Walker, 1998; Uchiyama, 1999) y, además, contienen epítomos termolábiles, algunos de ellos específicos de especie, que constituyen la base antigénica de la serotipificación. La proteína rOmpA se encuentra exclusivamente en las rickettsias del GFM y la proteína rOmpB se encuentra tanto en las rickettsias del GFM como en las del GT.

El citoplasma de estos microorganismos contiene numerosos ribosomas, enzimas glucolíticas, ADN y ARN (Walker and Raoult, 2002).

El genoma de las rickettsias es muy pequeño (1-1,6 Mb) y normalmente consiste en un solo cromosoma circular. En cuatro de las especies de rickettsia de las que se dispone del genoma completo la información genética también aparece repartida en un plásmido. Es el caso de *Rickettsia felis*, *R. massilliae*, *R. africae* y *Rickettsia peacockii*.

Hoy en día se conoce el genoma completo de 14 especies de rickettsia: *R. prowazekii* (cepas Madrid E, BuV67-CWPP, Chernikova, GvV257, Dachau, Katsinyian, RpGvF24, Rp22), *Rickettsia typhi* (cepas Wilmington, TH1527, B9991CWPP), *R. conorii* (cepa Malish 7), *Rickettsia rickettsii* (cepa “Sheila Smith”, Iowa, Hlp#2, Hino, Arizona, Brazil, Hauke), *R. felis* (cepa URRWXCAl2), *R. massilliae* (cepas MTU5, AZT80), *Rickettsia canadensis* (cepa McKiel), *Rickettsia bellii* (cepas RML369-C y OSU 85-389), *Rickettsia akari* (cepa Hartford), *R. africae* (ESF-5), *R. peacockii* (cepa Rustic), *Rickettsia heilongjiangensis* (cepa 054), *R. slovaca* (cepas 13B y D-CWPP) y *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* (cepa HA-91) (Anderson *et al.*, 1998; Ogata *et al.*, 2001; McLeod *et al.*, 2004; Ogata *et al.*, 2005; Eremeeva *et al.*, 2005; Ogata *et al.*, 2006, Blanc *et al.*, 2007; Ellison *et al.*, 2008; Fournier *et al.*, 2009; Felsheim *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2011; Fournier *et al.*, 2012; Sentausa *et al.*, 2012). En el caso de *Rickettsia montanensis* (cepa OSU 85-930), *Rickettsia australis* (cepa Cutlack), *Rickettsia parkerii* (cepa Portsmouth), *Rickettsia rhipicephali* (cepa 3-7-female6-CWPP), *Rickettsia japonica* y *R. canadensis* (cepas CA410, McKiel) el

genoma completo está disponible en GenBank, si bien, está pendiente de publicación.

La adaptación de las rickettsias a la vida intracelular ha llevado consigo una reducción del tamaño de su genoma. Paradójicamente, el estudio de la secuencia del genoma de *R. africae* sugiere que esta reducción está asociada a una mayor virulencia de las rickettsias (Fournier *et al.*, 2009). Así, las rickettsias del GT tienen genomas de 1.1 Mb, las rickettsias del GFM de 1.2-1.4 Mb, y el genoma de *R. bellii* es de 1.5 Mb.

El contenido en guanosina y citosina (G+C) también varía entre las rickettsias del GFM y del GT. Para el GFM es de 32-33%, mientras que en el GT es de 29%.

El genoma de las rickettsias contiene entre 900 y 1.500 genes. Cabe destacar una familia de 17 genes conocidos como genes *sca* (“surface cell antigen”). De entre ellos, tienen una gran importancia los genes *sca0* (*ompA*), *sca4* (*D*) y *sca5* (*ompB*). De los 17 genes sólo se conocen proteínas para los genes *ompA* y *ompB*. Estas proteínas han sido detectadas tanto mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio-dodecil-sulfato (SDS-PAGE) como por Inmunoblot. A pesar de la gran importancia que tienen estos dos genes en la adhesión de la rickettsia al hospedador, no están conservados entre todas las especies validadas de rickettsia. Así, el gen *ompA* se encuentra como pseudogen en *R. felis* y *R. akari*, fragmentado en *R. bellii* y no se amplifica en *R. helvetica*, *R. canadensis* y en las rickettsias GT (*R. prowazekii* y *R. typhi*). El gen *ompB* no se detecta en *R. canadensis*. Otros genes *sca* que no se pueden detectar en todas las especies de rickettsia son el gen *sca2*, que se encuentra como pseudogen en *R. helvetica* y *R. canadensis* y, de forma residual en rickettsias del GT, y el *sca4*, que aparece dividido en *R. prowazekii* y no se detecta en *R. canadensis*. Hasta el momento, el *sca1* es el único de esta familia de 17 genes que se encuentra presente en todas las especies validadas de rickettsia (Ngwamidiba *et al.*, 2006).

A diferencia de la mayoría de las bacterias, las rickettsias son parásitos intracelulares obligados, ya que carecen de algunos cofactores necesarios para la multiplicación celular. No obstante, son capaces de sintetizar adenosín trifosfato (ATP), y de utilizar la vía del glutamato como fuente de energía. Además, tienen una gran capacidad de adaptación para sobrevivir intracelularmente, ya que

poseen una gran variedad de mecanismos de transporte para obtener sustancias esenciales de la célula huésped (Higgins *et al.*, 1996).

Las rickettsias del GFM se encuentran libres tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células y tienen una temperatura óptima de crecimiento de 32°C. Por el contrario, las rickettsias del GT únicamente se localizan en el citoplasma y su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C.

Su ciclo vital transcurre, en parte o en su totalidad, en un artrópodo vector, en el que se comportan como comensales. Son muy lábiles y sobreviven poco tiempo fuera del huésped. Las rickettsias del GFM están asociadas principalmente a garrapatas, mientras que las del GT lo están a pulgas y piojos.

3.2. TAXONOMÍA

3.2.1. Posición taxonómica del género *Rickettsia*

La taxonomía de las rickettsias es muy compleja y ha experimentado cambios importantes en los últimos años.

Tradicionalmente, los microorganismos se han clasificado por su aspecto al microscopio y comportamiento con diferentes tinciones, así como por el aspecto de las colonias en los medios de cultivo y sus características bioquímicas y antigénicas. Sin embargo, los microorganismos intracelulares no se pueden clasificar mediante la mayoría de estos métodos. Durante muchos años se ha incluido en el orden Rickettsiales a las bacterias que únicamente tenían en común la necesidad de vivir en el interior de células eucariotas. Así, en los manuales de microbiología, el término “rickettsia” se ha utilizado indiscriminadamente para denominar a “cualquier microorganismo intracelular obligado, con aspecto de bacteria Gram negativa, cuyo crecimiento no se consigue en medios de cultivo artificiales y cuyo ciclo vital transcurre total o parcialmente en un artrópodo vector”.

En las últimas décadas, y gracias a la aplicación de las técnicas de biología molecular, se ha logrado caracterizar y clasificar a los microorganismos de una forma más precisa. El análisis y la comparación de las secuencias nucleotídicas de

los genes ha permitido no sólo clasificar y establecer una relación filogenética (árboles filogenéticos) entre los distintos organismos, sino también identificar nuevos agentes patógenos. De hecho, las ediciones vigentes de los dos tratados fundamentales de bacteriología, el “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” y “*The Prokaryotes*”, basan la estructuración de los microorganismos en estudios filogenéticos. El gen más utilizado para estos estudios es el que codifica una pequeña subunidad (16S) del ARN ribosomal (ARNr 16S) (gen *rrs*). La utilización de este gen para la clasificación e identificación de organismos fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970 (Woese, 1987). Dicho gen está presente en todos los organismos vivos, y consta de 1.500 nucleótidos y posee unas regiones muy conservadas que permiten la clasificación de las bacterias en clases, órdenes y familias, y otras más variables que permiten la clasificación en géneros y especies (Woese, 1987). El análisis de la secuencia de este gen de distintos grupos filogenéticos ha puesto de manifiesto la existencia de una o más secuencias características, que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su grupo (Woese *et al.*, 1985). Los estudios de la secuencia de este gen, llevados a cabo por Carl Woese, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de los seres vivos. Así, introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior y distribuyó los organismos celulares en tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas (Woese *et al.*, 1990). Esta clasificación es la que se acepta en la actualidad. El dominio *Bacteria* está dividido en doce grandes linajes o reinos: *Aquifex/Hydrogenobacter*, *Thermotoga*, Bacterias verdes no del azufre, *Deinococos* y parientes, Espiroquetas, Bacterias verdes del azufre, *Bacterioides*-Flavobacterias, *Planctomyces* y parientes, Clamydiae, bacterias Gram Positivas, Cianobacterias y Bacterias rojas o *Proteobacterias*. Este último grupo es el más amplio y diversificado fisiológicamente en el dominio *Bacteria* y comprende cinco subdivisiones: alfa, beta, gamma, delta y épsilon. El orden *Rickettsiales* pertenece a la subclase α_1 del

phylum *Proteobacteria* (Woese *et al.*, 1990) y está formado por seis géneros: *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* (Tabla 6). Otros géneros incluidos anteriormente en el orden *Rickettsiales*, como *Coxiella* y *Bartonella*, se han reclasificado en otras clases de *Proteobacteria* (Dumler *et al.*, 2001).

Tabla 6. Posición taxonómica del género *Rickettsia*.

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Subclase:	Alpha 1
Orden:	<i>Rickettsiales</i>
Géneros:	<i>Rickettsia</i>
	<i>Orientia</i>
	<i>Ehrlichia</i>
	<i>Anaplasma</i>
	<i>Neorickettsia</i>
	<i>Wolbachia</i>

3.2.2. División en grupos

Como ya se ha comentado, las rickettsias, debido a su condición intracelular obligada, no se pueden clasificar en base a los criterios fenotípicos normalmente utilizados en taxonomía. La diferenciación de grupos dentro de este género tradicionalmente, se ha basado en la existencia de una serie de características patogénicas, ecológicas (vectores y distribución geográfica) y antigénicas. Hasta 1995 el género *Rickettsia* incluía tres grupos: el GFM, el GT y el grupo tifus de los matorrales. En ese año, *Rickettsia tsutsugamushi* (agente causal del tifus de los matorrales) fue reclasificada en base a criterios genéticos (ARNr 16S), en un nuevo género: *Orientia*, que incluye una sola especie: *Orientia tsutsugamushi* (Tamura *et al.*, 1995). Así, en la actualidad, el género *Rickettsia* está dividido en dos grupos: GFM y GT, si bien, para algunos autores, existiría un tercer grupo denominado “grupo ancestral” formado por dos especies: *R. bellii* y

R. canadensis, que filogenéticamente serían anteriores a la división del género en los grupos GFM y GT (Stothard *et al.*, 1994).

3.2.3. Identificación de especies

Para identificar las distintas especies dentro del género se han utilizado a lo largo de los años diferentes métodos: técnicas serológicas, estudios de las proteínas y técnicas de biología molecular.

3.2.3.1. Técnicas serológicas

Desde 1978, la microinmunofluorescencia indirecta (MIF) con suero policlonal de ratón constituye el método de referencia para la diferenciación del género en grupos y especies. En esta técnica se utilizan las proteínas de superficie rOmpA y rOmpB como determinantes antigénicos (Philip *et al.*, 1978) y sus resultados son aceptados por el Comité del “International Journal of Systematic Bacteriology” para la clasificación de las nuevas especies aisladas. No obstante, este método tiene el inconveniente de la existencia de reacciones cruzadas, ya que algunos epítomos de los antígenos proteicos son compartidos entre los diferentes miembros de cada grupo, lo que dificulta la distinción de especies. Otro problema importante que plantea esta técnica es la necesidad de disponer de antisuero de todas las especies de *Rickettsia*, y su laboriosidad. La MIF, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de especie es más sencilla de realizar y aporta una mayor especificidad, si bien existe una gran dificultad a la hora de obtener los anticuerpos monoclonales (La Scola and Raoult, 1997).

3.2.3.2. Análisis de las proteínas

La técnica más utilizada para el análisis de las proteínas de las rickettsias es la SDS-PAGE. Mediante esta técnica se obtienen dos bandas proteicas de elevado peso molecular que corresponden a las proteínas de superficie rOmpA y rOmpB. Estas bandas están presentes en la mayoría de las especies (en las del GT sólo rOmpB), pero su movilidad electroforética es característica en cada una de ellas, lo que permite su diferenciación. Este método también presenta algunos inconvenientes. Es muy laborioso y lento y además es poco reproducible, ya que los resultados dependen en gran parte de las condiciones de preparación del gel y

de su temperatura de solubilización (La Scola and Raoult, 1997; Raoult and Roux, 1997).

3.2.3.3. Técnicas de biología molecular

Las técnicas de biología molecular constituyen en la actualidad uno de los métodos más utilizados para la identificación de especies.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de ADN. Esta técnica fue descrita por K. Mullis en 1985 y en la actualidad se aplica en distintos campos de la medicina, entre ellos la microbiología clínica. Así, permite la detección y la amplificación de fragmentos de ADN de distintos microorganismos y su posterior identificación con otras técnicas como la restricción enzimática o la secuenciación de los productos amplificados.

PCR-RFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de los productos amplificados por PCR): Los fragmentos de los genes amplificados mediante PCR se digieren mediante determinadas enzimas de restricción, que cortan el ADN dando lugar a una serie de bandas características de cada especie (Regnery *et al.*, 1991; Eremeeva *et al.*, 1994a).

Secuenciación: La secuenciación de los productos amplificados por PCR se realiza en la actualidad mediante secuenciadores automáticos. Una vez obtenida esta secuencia, se compara con las depositadas en distintas bases de datos. Los genes más utilizados para el análisis filogenético son los siguientes: los genes que codifican la síntesis de ARNr 16S (*rrs*) y la síntesis de la enzima citrato sintasa (*gltA*); el gen *htrA*, que codifica una proteína de 17kDa; los genes que codifican la síntesis de dos proteínas de superficie (rOmpA y rOmpB) y el gen que codifica la síntesis de la proteína PS120 (gen D). El gen que codifica la síntesis de ARNr 16S y el gen *htrA* son útiles para la identificación a nivel de género, pero su secuencia es muy similar en todas las especies (97,2-99,9%), por lo que no se consideran válidos para su diferenciación (Roux *et al.*, 1997; Fournier *et al.*, 1998a; Roux and Raoult, 2000; Fournier *et al.*, 2003a).

Tanto las técnicas serológicas, como el análisis de proteínas y las técnicas de biología molecular aparecen más desarrolladas en el apartado de diagnóstico de rickettsiosis.

Como ya se ha mencionado, en la actualidad la clasificación de los microorganismos se basa en técnicas de biología molecular. No obstante, es importante destacar que, en el caso de las rickettsias, la interpretación de los resultados obtenidos mediante estas técnicas es compleja y no existe un consenso definitivo para establecer el porcentaje de divergencia que debe existir en las secuencias de los genes para definir especies, subespecies y cepas.

En el año 2003 Fournier y cols. propusieron unas “guías genéticas” para la clasificación de estos microorganismos en grupos y especies. Según estos autores, para la identificación correcta de un aislado a nivel de especie, es necesaria la secuenciación de un mínimo de 5 genes: gen D y genes que codifican la síntesis de ARNr 16S, citrato sintasa, rOmpA y rOmpB. El grado de similitud entre la secuencia nucleotídica del aislado y la de la especie correspondiente debe ser \geq al 99,3% en el caso del gen D, \geq al 99,8% en el del gen del ARNr 16S, \geq al 99,9% para *gltA*, \geq al 98,8% para *ompA* y \geq al 99,2% para *ompB* (Fournier *et al.*, 2003a). Un año más tarde, estos mismos autores demostraron que las secuencias más adecuadas para el genotipado de cepas bacterianas eran las que presentaban mayor variabilidad al alinear los genomas de dos bacterias estrechamente relacionadas. Así, al coalinear los genomas de *R. conorii* (GFM) y de *R. prowazekii* (GT), observaron que la mayor variabilidad se encontraba en los “espacios intergénicos variables”. Posteriormente, se ha demostrado que la combinación de secuencias de 3 “espacios intergénicos variables” permite una discriminación a nivel de especie superior a la de la secuenciación de genes múltiples. Esta técnica, a la que se ha denominado “multispacer typing” (MST), además del elevado poder de discriminación, presenta otras ventajas, como la reproducibilidad, la simplicidad de interpretación y la fácil incorporación de los resultados obtenidos en las bases de datos (Parola *et al.*, 2005). En cualquier caso, en la actualidad, no existe un acuerdo definitivo por parte de los expertos que trabajan en el campo de las rickettsiosis en cuanto a la definición de especies. Esta falta de consenso, junto con la continua identificación de nuevas especies en muestras humanas, hacen

imposible la existencia de una única clasificación de las rickettsias. Por otra parte, en los últimos años, la identificación de algunas de las nuevas especies, tanto en artrópodos como en muestras humanas, se ha realizado exclusivamente mediante técnicas de biología molecular. Para que estas especies sean reconocidas como tales es imprescindible su aislamiento en líneas celulares. En 2005 se propuso un consenso por el cual, las especies que se han identificado genéticamente pero que no se han aislado en cultivo celular sean clasificadas provisionalmente como *Candidatus* (Raoult *et al.*, 2005).

En la última edición del “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, el género *Rickettsia* está dividido en tres grupos basados en su filogenia y cuenta con 21 especies validadas:

1. **GT**, con dos especies: *R. typhi* y *R. prowazekii*.
2. **GFM**, en el que se incluyen: *R. aeschlimannii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. peacockii*, *R. rhipicephali*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, y *R. slovacica*.
3. **“Grupo ancestral”** que incluye: *R. bellii* y *R. canadensis* (Fournier *et al.*, 2003a).

En esta clasificación no se encuentran incluidas algunas especies identificadas en muestras humanas como *R. honei*, *R. heilongjiangensis* y *R. monacensis*. Tampoco están incluidas *R. mongolitimonae*, *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. conorii* subsp. *indica* y *Rickettsia marmionii*, consideradas como especies por la mayoría de los autores. Si bien, para algunos de ellos no constituirían auténticas especies, sino subespecies. Así, *R. mongolitimonae* estaría incluida en la especie *R. sibirica*, *R. conorii* subsp. *caspiensis*, *R. conorii* subsp. *israelensis* y *R. conorii* subsp. *indica* en la especie *R. conorii* (Fournier *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2005) y *R. marmionii* en la especie *R. honei* (Parola *et al.*, 2005).

En esta lista tampoco se encuentra *R. raoultii* (cepas Khabarovsk, Marne y Elanda), cultivada en 2008 y que engloba los genotipos de rickettsia RpA4,

DnS14 y DnS28, asociados con garrapatas del género *Dermacentor* en Europa y Rusia (Mediannikov *et al.*, 2008). Esta rickettsia ha sido, además, amplificada en garrapatas retiradas de pacientes que han desarrollado DEBONEL/TIBOLA (Parola *et al.*, 2009).

Otra rickettsia que no aparece en esta clasificación es *Candidatus Rickettsia rioja*. Esta rickettsia patógena fue detectada en la sangre de dos pacientes con DEBONEL/TIBOLA en 2006 y actualmente se encuentra en proceso de validación.

El avance de la biología molecular ha hecho que en los últimos 20 años el número de especies del género rickettsia haya aumentado considerablemente, existiendo en la actualidad 34 especies reconocidas y nombradas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). En la siguiente tabla aparecen los diferentes grupos en los que está dividido el género *Rickettsia* en la actualidad (Merhej and Raoult, 2011).

Tabla 7. Clasificación en grupos de las diferentes especies de rickettsia de acuerdo al análisis filogenético de los genes ARNr 16S, *gltA*, *ompA* y *ompB*.

GFM	Grupo <i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>R. rickettsii</i> <i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>caspia</i> <i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i> <i>Rickettsia africae</i> <i>Rickettsia parkeri</i> <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> <i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i> <i>Rickettsia slovaca</i> <i>Rickettsia honei</i> <i>Rickettsia japonica</i> <i>Rickettsia heilongjiangensis</i> <i>Rickettsia peacockii</i> <i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>
	Grupo <i>Rickettsia massiliae</i>	<i>R. massiliae</i> <i>Rickettsia rhipicephali</i> <i>Rickettsia aeschlimannii</i> <i>Rickettsia montanensis</i> <i>Rickettsia raoultii</i>
	Grupo <i>Rickettsia helvetica</i>	<i>R. helvetica</i> <i>Rickettsia asiatica</i> <i>Rickettsia tamurae</i> <i>Rickettsia monacensis</i>
	Grupo <i>Rickettsia akari</i>	<i>R. akari</i> <i>Rickettsia australis</i> <i>Rickettsia felis</i>
GT	Grupo <i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>R. prowazekii</i> <i>Rickettsia typhi</i>
	Grupo <i>Rickettsia canadensis</i>	<i>R. canadensis</i>
	Grupo <i>Rickettsia bellii</i>	<i>R. bellii</i>

GFM: *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas, GT: *Rickettsia* del grupo tifus.

En esta clasificación no aparecen 3 especies de rickettsia que, en la actualidad ya se encuentran validadas: *Rickettsia monteiroi*, *Rickettsia gravesii* y *Rickettsia hoogstraalii*. Pacheco y cols. en 2011, establecieron, tras analizar filogenéticamente los genes *gltA*, *rrs*, *htrA* y *scaI*, que *R. monteiroi* pertenecía al grupo de *R. canadensis*. Esta rickettsia ha sido detectada en garrapatas

Amblyomma incisum en Brasil y por el momento no ha sido asociada con patología humana (Pacheco *et al.*, 2011). Lo mismo ocurre con *Rickettsia hoogstraalii* y *Rickettsia gravesii*, amplificadas en *Haemaphysalis sulcata* y *Haemaphysalis punctata*, y en *Amblyomma triguttatum* respectivamente, y no asociadas con enfermedad (Li *et al.*, 2010; Duh *et al.*, 2010)

En el NCBI existen, además, secuencias de 16 especies *Candidatus* (tabla 8) y más de 50 *Rickettsia* spp. no caracterizadas, que sí que han sido depositadas pero que están pendientes de identificación y descripción.

Tabla 8. Especies de rickettsia en estado *Candidatus* que aparecen en el NCBI (mayo 2012).

<i>Candidatus Rickettsia</i> sp.
<i>Candidatus Rickettsia amblyommii</i>
<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i>
<i>Candidatus Rickettsia goldwasserii</i>
<i>Candidatus Rickettsia antechini</i>
<i>Candidatus Rickettsia kellyi</i>
<i>Candidatus Rickettsia kotlanii</i>
<i>Candidatus Rickettsia rara</i>
<i>Candidatus Rickettsia barbarie</i>
<i>Candidatus Rickettsia davousti</i>
<i>Candidatus Rickettsia uilenbergi</i>
<i>Candidatus Rickettsia principis</i>
<i>Candidatus Rickettsia siciliensis</i>
<i>Candidatus Rickettsia rioja</i>
<i>Candidatus Rickettsia tasmanensis</i>
<i>Candidatus Rickettsia tarasevichiae</i>
<i>Candidatus Rickettsia kulagini</i>
<i>Candidatus Rickettsia vini</i>
<i>Candidatus Rickettsia colombianensi</i>

3.3. RICKETTSIAS IMPLICADAS EN PATOLOGÍA HUMANA

A pesar de que algunas rickettsiosis son bien conocidas desde la Antigüedad, en la actualidad pueden considerarse como un claro ejemplo de “enfermedades emergentes y re-emergentes”. En la última década se han producido brotes epidémicos en distintos lugares del mundo de TE (*R. prowazekii*), infección asociada a situaciones de pobreza, hacinamiento y falta de higiene que se creía controlada. También se ha constatado un incremento en la incidencia de rickettsiosis del GFM, probablemente relacionado con un aumento en el número de garrapatas y con el mayor acercamiento del hombre a las mismas (Azad and Beard, 1998). Pero, sobre todo, se han logrado importantes avances en el conocimiento de estas enfermedades. Así, a nivel epidemiológico, se han identificado nuevos reservorios: ardillas voladoras (*Glaucomys volans*) como reservorio del TE (Bozeman *et al.*, 1975) y zarigüeyas en el caso del tifus murino (TM) (Schriefer *et al.*, 1994a); y nuevos vectores (*Ctenocephalides felis* para el TM) (Higgins *et al.*, 1996). Asimismo, se han reconocido nuevas especies de rickettsias implicadas en patología humana. Hasta el año 1974 únicamente se conocían 8 especies patógenas para el hombre. Desde 1991 y hasta la actualidad se han identificado 15 especies en muestras humanas (*R. honei*, *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. africae*, *R. felis*, *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. slovacae*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. parkeri*, *R. heilongjiangensis*, *R. marmionii*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *Candidatus Rickettsia rioja* y *Candidatus Rickettsia kellyi*) y se han descrito las enfermedades correspondientes (Tabla 9). En las últimas décadas también se han identificado nuevas especies en artrópodos vectores. Aunque en estos momentos no se ha demostrado su poder patógeno, es lógico pensar que las especies encontradas en artrópodos capaces de picar al hombre (tarde o temprano) serán implicadas como agentes patógenos humanos.

Tabla 9. *Rickettsia* spp. implicadas en patología humana.

Especie	Enfermedad	Vector	Año implicación microbiológica	Distribución
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Tifus epidémico	<i>Pediculus humanus corporis</i>	1918	Universal
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma aureolatum</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1919	Continente Americano (excepto Canadá y Alaska)
<i>Rickettsia typhi</i>	Tifus murino	<i>Xenopsylla cheopis</i>	1920	Universal
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	Fiebre botonosa	<i>R. sanguineus</i>	1932	Mediterráneo, África, India, Mar Negro
<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	Tifus por garrapatas del Norte de Asia	<i>Dermacentor nuttalli</i>	1946	Asia, Europa
<i>Rickettsia australis</i>	Tifus por garrapatas de Queensland	<i>Ixodes holocyclus</i> <i>Ixodes tasmanii</i>	1946	Australia

Especie	Enfermedad	Vector	Año implicación microbiológica	Distribución
<i>Rickettsia akari</i>	Rickettsiosis varioliforme o pustulosa	<i>Allodermanyssus sanguineus</i>	1948	EEUU, Ucrania, Turquía, Kosovo
<i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	Fiebre exantemática de Israel	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1971	Israel, Portugal, Sicilia
<i>Rickettsia japonica</i>	Fiebre exantemática japonesa	<i>Haemaphysalis longicornis</i> <i>Haemaphysalis flava</i> <i>Dermacentor taiwanensis</i> <i>Ixodes ovatus</i>	1985	Japón, Tailandia
<i>Rickettsia honei</i>	Fiebre exantemática de las Islas Flanders	<i>Amblyomma hydrosauri</i>	1991	Australia, Tailandia, Nepal
<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	Fiebre de Astracán	<i>Rhipicephalus pumilio</i> <i>R. sanguineus</i>	1991	Astracán, Kosovo, Chad
<i>Rickettsia africae</i>	Fiebre africana por picadura de garrapata	<i>Amblyomma hebraeum</i> <i>Amblyomma variegatum</i>	1992	África, Isla de Guadalupe, Oceanía, Turquía

Especie	Enfermedad	Vector	Año implicación microbiológica	Distribución
<i>Rickettsia felis</i>	Tifus murino	<i>Ctenocephalides felis</i> <i>Ctenocephalides canis</i>	1994	EEUU, Méjico, Japón, Europa, África
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Innominada	<i>Dermacentor silvarum</i>	1996	China, Este de Rusia, Japón
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>	LAR	<i>Hyalomma asiaticum</i> <i>Hyalomma truncatum</i>	1996	China, África, Francia, Portugal, España
<i>Rickettsia slovacica</i>	DEBONEL/TIBOLA	<i>Dermacentor marginatus</i>	1997	Europa
<i>Rickettsia helvetica</i>	Innominada	<i>Ixodes ricinus</i>	1999	Europa, Japón
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	Innominada	<i>Hyalomma marginatum</i> <i>Rhipicephalus apendiculatus</i>	2002	Europa, África
<i>Rickettsia parkeri</i>	Innominada	<i>Amblyomma maculatum</i>	2004	Continente Americano (excepto Canadá y Alaska)
<i>Rickettsia marmionii</i>	Innominada	Desconocido	2005	Australia

Especie	Enfermedad	Vector	Año implicación microbiológica	Distribución
<i>Rickettsia massiliae</i>	Innominada	<i>R. sanguineus</i>	2005	Europa, Argentina
<i>Candidatus Rickettsia rioja</i>	DEBONEL/TIBOLA	<i>D. marginatus</i>	2006	España
<i>Candidatus Rickettsia kellyi</i>	Innominada	Desconocido	2006	India
<i>Rickettsia monacensis</i>	Innominada	<i>I. ricinus</i>	2007	España
<i>Rickettsia raoultii</i>	DEBONEL/TIBOLA	<i>D. marginatus</i> <i>Demacentor reticulatus</i>	2008	Europa

LAR: Linfangitis asociada rickettsiosis

DEBONEL/TIBOLA: Linfadenopatía, eritema y necrosis por *Demacentor* /Linfadenopatía transmitida por garrapatas

3.4. PRINCIPALES RICKETTSIOSIS PRESENTES EN EUROPA

3.4.1. Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas

La mayoría de estas infecciones tienen un comienzo agudo, cursan con fiebre, cefalea y mialgias. En muchas de ellas es típica la aparición de un exantema, más o menos generalizado (en ocasiones purpúrico) con afectación de palmas y plantas de las extremidades. También en muchas de ellas aparece una escara o punto de necrosis en el punto de inoculación (ocasionalmente varias). El pronóstico y la gravedad son variables, y dependen de la especie de *Rickettsia* implicada y del estado previo del paciente. Generalmente estas enfermedades se acompañan de alteraciones analíticas inespecíficas como aumento de la velocidad de sedimentación glomerular (VSG), trombocitopenia, leucocitosis o leucopenia, anemia normocítica normocrómica y elevación moderada y transitoria de las enzimas hepáticas. También puede existir aumento de enzimas musculares, hiponatremia e hipoalbuminemia. En la orina se puede observar albuminuria y alteraciones del sedimento urinario.

Todas estas zoonosis responden satisfactoriamente al tratamiento con doxiciclina y otros antibióticos, si bien en algunos casos puede haber complicaciones, e incluso fallecer el paciente.

A continuación se detallan las principales rickettsiosis presentes en nuestro medio:

3.4.1.1. Fiebre exantemática mediterránea o fiebre botonosa

La FB es una zoonosis causada por *R. conorii* subsp. *conorii* y transmitida por la picadura de la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*, y posiblemente por otras garrapatas del mismo género como *Rhipicephalus turanicus* y *Rhipicephalus bursa*.

La garrapata implicada en su transmisión actúa como vector y como reservorio, puesto que existe transmisión transestadial y transovárica del microorganismo. Los perros y los grandes mamíferos constituyen los hospedadores habituales de *R. sanguineus* y actúan amplificando el vector en el medio.

La FB fue descrita por primera vez en Túnez, en 1910, por Conor y Bruch. Esta zoonosis es endémica en numerosos países de la cuenca mediterránea (España,

Portugal, Francia, Croacia, área del Adriático), Norte de África y África Subsahariana, India y alrededor del Mar Negro (Raoult and Roux, 1997; Rovero *et al.*, 2008). En nuestro medio es conocida desde 1929 (Tapia, 1929) y constituye la rickettsiosis exantemática más frecuente.

La FB aparece fundamentalmente durante el verano, con una incidencia máxima en el mes de agosto (época de mayor actividad del vector).

El periodo de incubación oscila entre 4 y 21 días, siendo habitualmente de unos 7 días.

La lesión de inoculación, mancha negra o “tache noire” aparece, en el 30-90% de los casos al comienzo de la enfermedad, antes de la aparición de la fiebre, y ocasionalmente puede ser múltiple (9-11% según algunas series) (Jufresa *et al.*, 1997; Antón *et al.*, 2003). Al inicio se trata de una pequeña pústula que al cabo de unos días se ulcera, se recubre de una escara negra y se rodea de un halo eritematoso. Es indolora, permanece durante todo el estado febril y cura sin dejar cicatriz. De forma brusca aparece fiebre alta (100%), escalofríos, fotofobia, cefalea y artromialgias. Otras manifestaciones que aparecen con relativa frecuencia son conjuntivitis, vómitos y diarreas. A los 3-5 días del inicio de la fiebre suele aparecer el exantema, que generalmente es de tipo maculopapular, no pruriginoso y, en ocasiones petequial o purpúrico. Se inicia alrededor de la mancha negra, posteriormente se extiende al tronco, cuero cabelludo, cara, extremidades y característicamente afecta a palmas y plantas. La FB generalmente es una enfermedad benigna con baja mortalidad, que se resuelve espontáneamente en 10-20 días sin dejar secuelas. Sin embargo en el 5-12% de los casos se pueden producir complicaciones graves. Estas formas graves se caracterizan por afectación visceral importante, debida a una vasculitis sistémica, y se asocian a una mortalidad superior al 2,5%. La insuficiencia renal por lesión tubulointersticial o glomerular, constituye la complicación visceral más frecuente. También pueden existir manifestaciones digestivas como gastritis hemorrágica, pancreatitis, colecistitis alitiásica y hepatitis. Como complicaciones hematológicas se han descrito la coagulación intravascular diseminada y la tromboflebitis. También se han descrito alteraciones cardiorrespiratorias como arritmias, pericarditis y miocarditis, neumonías, bronconeumonías, insuficiencia respiratoria aguda y derrames pleurales. Por último, pueden aparecer complicaciones

neurológicas como encefalitis y accidentes cerebro vasculares agudos. Estas formas son más frecuentes en pacientes de edad avanzada y con enfermedades subyacentes y en pacientes con déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, así como en los pacientes en los que se demora el inicio del tratamiento antibiótico (Rios *et al.*, 1992; Laynez *et al.*, 1994; Mora *et al.*, 1995; Jufresa *et al.*, 1997; Sculler, 1997; Xicoy *et al.*, 2000; Franca *et al.*, 2003).

3.4.1.2. Fiebre manchada de Israel

La fiebre manchada de Israel está causada por *R. conorii* subsp. *israelensis*, aislada y caracterizada en 1971 por Goldwasser y cols. (Goldwasser *et al.*, 1974). Esta rickettsiosis se transmite por la picadura de *R. sanguineus*.

Los primeros casos se describieron en la década de 1940 en Israel, donde esta zoonosis es endémica. Posteriormente se documentaron casos en Portugal (Bacellar *et al.*, 1999) y Sicilia (Giammanco *et al.*, 2005). Recientemente se han descrito dos casos en Túnez (Znazen *et al.*, 2011).

En la actualidad se ha demostrado que aproximadamente la mitad de los casos de FB en Portugal están causados por *R. conorii* subsp. *israelensis* (de Sousa *et al.*, 2005). Hasta el momento no se han descrito casos ni en Francia, ni en España.

Las manifestaciones clínicas de esta zoonosis son similares a las de la FB clásica. El periodo de incubación es de aproximadamente 7 días y el exantema está presente en prácticamente la totalidad de los casos. Tradicionalmente se consideraba que la escara en el punto de inoculación era mucho menos frecuente que en la FB clásica. No obstante, algunos estudios realizados en los últimos años en Portugal han demostrado que aparece con la misma frecuencia en ambas infecciones (de Sousa *et al.*, 2005).

La enfermedad puede ser grave y se han descrito casos de evolución fatal tanto en Israel como en Portugal y Sicilia (mortalidad 0,7-3,2%) (Aharonowitz *et al.*, 1999; Giammanco *et al.*, 2005; Weinberger *et al.*, 2008; de Sousa *et al.*, 2008a). En un trabajo llevado a cabo por de Sousa y cols. en Portugal se ha descrito que las infecciones debidas a *R. conorii* subsp. *israelensis* tienen mayor mortalidad que las producidas por *R. conorii* subsp. *conorii* (de Sousa *et al.*, 2008a).

En 2008, también se registró un caso fatal en un paciente tras un crucero por el mediterráneo (Boillat *et al.*, 2008). En ninguno de los países que visitó se había descrito la infección por *R. conorii* subsp *israelensis* pero, teniendo en cuenta el periodo de incubación, probablemente contrajo la infección en Libia.

3.4.1.3. DEBONEL/TIBOLA

Es una enfermedad cuyos agentes etiológicos son *R. slovacica*, *C. R. rioja* y, probablemente *R. raoultii*. *R. slovacica* fue aislada por primera vez en Sula (actual República de Eslovaquia) en *D. marginatus* (Rehacek, 1984). Posteriormente se ha identificado, mediante técnicas de biología molecular y cultivos celulares, en *D. marginatus* y *Dermacentor reticulatus* en Armenia, Suiza, Yugoslavia, Francia, Portugal, Alemania, Hungría, Rusia, Ucrania, y España (Raoult, 2003).

En 2003, *R. slovacica* se aisló en medios de cultivo a partir de la biopsia de la piel de un paciente que había desarrollado DEBONEL/TIBOLA, quedando así demostrada su implicación en patología humana (Cazorla *et al.*, 2003).

Previamente, nuestro grupo, ya apuntó la posibilidad de que otras especies de rickettsias pudieran estar implicadas en algunos casos de DEBONEL/TIBOLA en La Rioja (Oteo *et al.*, 2004a). Estas rickettsias, anteriormente conocidas en la literatura como *Rickettsia* sp. genotipos RpA4, DnS14 y DnS28, han sido amplificadas en garrapatas en Rusia y en España (Rydkina *et al.*, 1999; Shpynov *et al.*, 2001; Shpynov *et al.*, 2004, Ibarra *et al.*, 2005). En 2008 fueron cultivadas y red denominadas como *R. raoultii* (cepas Elanda, Marne y Khabarovsk) (Mediannikov *et al.*, 2008).

Otra especie de rickettsia implicada en los casos de DEBONEL/TIBOLA en España (Portillo *et al.*, 2009; Pérez-Pérez *et al.*, 2010) es *Candidatus Rickettsia rioja*. Resultados preliminares llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo sugieren que esta rickettsia es responsable de al menos la mitad de los casos de DEBONEL/TIBOLA en España. Esta rickettsia ha sido amplificada por PCR en la sangre de pacientes con DEBONEL/TIBOLA, así como en ejemplares de *D. marginatus* recogidos sobre la vegetación, sobre animales y retirados de pacientes que habían desarrollado DEBONEL/TIBOLA (Ibarra, 2007). En 2009

se caracterizó genéticamente (Portillo *et al.*, 2009) y actualmente se encuentra en proceso de validación.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, esta infección se caracteriza por el desarrollo de una escara en el punto de inoculación de la garrapata. Esta lesión, que suele de mayor tamaño que las que se observan en otras rickettsiosis, aparece rodeada por un halo eritematoso que recuerda, en algunos casos, al eritema migratorio de la enfermedad de Lyme. El otro gran signo típico de esta infección es la presencia de linfadenopatías satélite dolorosas. A diferencia de otras rickettsiosis, la fiebre aparece en menos de la mitad de los casos, y es de bajo grado. No suelen presentarse otras manifestaciones sistémicas. La proteína C reactiva, así como las transaminasas suelen estar elevadas de forma moderada.

La mayor parte de los casos suele darse en los meses fríos del año, y la picadura de *D. marginatum* tiene lugar, en la mayoría de los casos (90%) en la cabeza (Raoult *et al.*, 2002a; Oteo *et al.*, 2004a; Ibarra *et al.*, 2006).

3.4.1.4. Linfangitis asociada a rickettsiosis (LAR)

Esta infección está causada por *R. sibirica* subsp. *mongolitimoniae*. Esta rickettsia fue identificada por primera vez en garrapatas *Hyalomma asiaticum* en 1991 en Mongolia (Yu *et al.*, 1993) y, hasta 1996 no se implicó en patología humana (Raoult *et al.*, 1996).

En 1996 y 1998 fue aislada de la sangre y de la piel de dos pacientes en Marsella. Ambos tenían manifestaciones clínicas similares: fiebre, escara en el punto de inoculación, linfadenopatía y linfangitis (Raoult *et al.*, 1996; Fournier *et al.*, 2000a).

Posteriormente, este microorganismo se detectó, mediante PCR (gen *ompA*), en la biopsia de piel de un paciente con un cuadro clínico similar en Sudáfrica (Pretorius and Birtles, 2004).

En Francia se han descrito las características de 7 pacientes (diagnosticados mediante cultivo o PCR). Todos los casos se produjeron durante la primavera. Los 7 pacientes presentaron fiebre elevada y escara en el punto de inoculación, que fue múltiple en el 22% de los casos. Además, en aproximadamente la mitad de los pacientes se observaron linfadenopatías regionales y linfangitis. La evolución fue

favorable en todos los casos (Fournier *et al.*, 2005). En la actualidad, los únicos vectores reconocidos de la enfermedad son *H. asiaticum* (garrapata ampliamente distribuida en distintas zonas de China y cuya presencia no se ha detectado fuera de este país) y *Hyalomma truncatum* (África). Ninguno de los pacientes diagnosticados en Francia refería el antecedente de haber viajado a esos países. Como explicación a la infección por un microorganismo cuyo vector reconocido no existe en la zona, en un principio se sugirió que algunas aves migratorias podrían ser hospedadores de esta especie de garrapata y que habrían sido las responsables de la diseminación de la infección. No obstante, aunque no se ha podido documentar en ningún caso, en la actualidad se piensa que *Hyalomma dromedarii* (especie presente en Francia) probablemente ha sido la garrapata implicada en la transmisión (Fournier *et al.*, 2000a).

R. sibirica subsp. *mongolitimonae* también se ha detectado (PCR) en un paciente con fiebre y exantema en Creta, así como en la garrapata implicada en la picadura (*Hyalomma anatolicum excavatum*) (Psaroulaki *et al.*, 2005).

En los últimos años se han descrito casos en Portugal, España y Egipto (de Sousa *et al.*, 2006; Aguirrebengoa *et al.*, 2008; de Sousa *et al.*, 2008b; Socolovschi *et al.*, 2010b; Ibarra *et al.*, 2012). En el último caso publicado de esta infección, en España, el paciente sufrió un shock séptico (Ibarra *et al.*, 2012).

En Portugal, además, se ha identificado esta *Rickettsia* sp. en un ejemplar adulto de *Rhipicephalus pusillus* que fue retirado de un paciente que desarrolló enfermedad, sugiriéndose la implicación de esta especie de garrapata en la transmisión de la enfermedad (de Sousa *et al.*, 2006).

3.4.1.5. Infección por *Rickettsia helvetica*

R. helvetica se ha identificado en *I. ricinus* de distintas zonas de Europa: Suiza, Francia, Eslovenia, Suecia, Alemania, Holanda, Portugal, Italia, España, Austria, Polonia, Dinamarca, Serbia y Reino Unido. También se ha identificado en *Ixodes ovatus* e *Ixodes persulcatus* en Japón (Fournier *et al.*, 2002; Fernández-soto *et al.*, 2004; Nijhof *et al.*, 2007; Floris *et al.*, 2008; Márquez, 2008; Silaghi *et al.*, 2008; Dobler *et al.*, 2008; Stańczak *et al.*, 2009; Boretti *et al.*, 2009; Chmielewski *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009; Elfving *et al.*, 2010; Severinsson

et al., 2010; Hildebrandt *et al.*, 2011; Radulović *et al.*, 2011; Burri *et al.*, 2011; Tijssen-Klasen *et al.*, 2011; Palomar *et al.*, 2012).

En los últimos años se la ha relacionado, de forma más o menos consistente, con distintas enfermedades en el hombre. Así, en 1997 se implicó como responsable de un caso de meningoencefalitis sin exantema, ni escara, ni linfadenopatía en Francia (Fournier *et al.*, 2000b). En este caso el diagnóstico etiológico se realizó únicamente mediante métodos serológicos. También mediante técnicas serológicas se ha relacionado con algunos síndromes febriles, acompañados de cefalea, sin exantema, que aparecen tras la picadura de garrapatas en Suiza, Francia, Italia y Tailandia (Baumann *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2004). En 1999 este microorganismo se identificó mediante técnicas de PCR y tinciones en muestras de necropsia de dos pacientes que habían fallecido a consecuencia de una miopericarditis aguda (Nilsson *et al.*, 1999). En el año 2002, se detectó por PCR y por métodos inmunohistoquímicos la presencia de *R. helvetica* en granulomas de dos pacientes con sarcoidosis (Nilsson *et al.*, 2002). Estos resultados son controvertidos y, finalmente se han achacado a una contaminación (Svendsen *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha amplificado por PCR en las muestras de un paciente con meningitis y en otro con síndrome febril, exantema y miastenia (Nilsson *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2010).

3.4.1.6. Infección por *Rickettsia aeschlimannii*

R. aeschlimannii fue identificada en 1997, en Marruecos, en *Hyalomma marginatum* (Beati *et al.*, 1997). Posteriormente se ha aislado en esta especie de garrapata en otras zonas del continente africano (Zimbabwe, Nigeria, Malí, Senegal), así como en Portugal, Croacia, Grecia (Parola and Raoult, 2001; Parola *et al.*, 2005), España (Fernández-Soto *et al.*, 2003; Oteo *et al.*, 2006a) y Rusia (Shpynov *et al.*, 2009).

Recientemente se ha detectado en *Hyalomma aegyptium* en Argelia y en Turquía (Bitam *et al.*, 2009; Gargili *et al.*, 2012) y en España también se ha detectado en *Haemaphysalis inermis* (Portillo *et al.*, 2008).

Hasta la fecha se han detectado, mediante PCR, dos casos de infección por este microorganismo en el hombre. El primero de ellos se describió en Francia en el año 2002. Se trataba de un paciente que, tras regresar de un viaje a Marruecos, desarrolló una escara acompañada de fiebre elevada y de exantema maculopapular generalizado. Mediante técnicas de PCR se detectó la presencia de *R. aeschlimannii* en el suero (Raoult *et al.*, 2002b). Posteriormente, se comunicó la infección por este microorganismo en un paciente en Sudáfrica. Este paciente acudió a la consulta con una garrapata en el muslo, alrededor de la cual se había desarrollado una escara. Antes de la retirada de la garrapata se inició tratamiento con doxiciclina. El artrópodo fue identificado como *Rhipicephalus appendiculatus*. Mediante técnicas de PCR se detectó ADN de *R. aeschlimannii* en la biopsia cutánea y en la garrapata. Los autores de este hallazgo, atribuyen la ausencia de otras manifestaciones clínicas al inicio precoz del tratamiento antibiótico (Pretorius and Birtles, 2002). Por último, se han comunicado dos casos en Túnez y otros dos en Argelia, si bien el diagnóstico se ha realizado en ambos casos mediante técnicas serológicas (inmunoblot y absorción cruzada) (Znazen *et al.*, 2006; Mokrani *et al.*, 2008).

3.4.1.7. Infección por *Rickettsia monacensis*

R. monacensis fue aislada por primera vez en el año 2002 en *I. ricinus* recogidos en Munich (Alemania) (Simser *et al.*, 2002). Posteriormente, se ha detectado en esta misma especie de garrapata en Eslovaquia, Italia, Algeria, Suiza, Serbia, Alemania, Portugal y España, así como en *Ixodes niponensis* en Japón (Florin *et al.*, 2008 ; Silaghi *et al.*, 2008; Márquez, 2008; Dib *et al.*, 2009; Dobler *et al.*, 2009; Hildebrant *et al.*, 2011; Burri *et al.*, 2011; Radulovic *et al.*, 2011; Palomar *et al.*, 2012).

En el año 2005, se consiguió el aislamiento de *R. monacensis* a partir de la sangre de un paciente procedente de La Rioja (Nº de acceso en GenBank DQ157778). Este paciente había ingresado en nuestro Hospital, en junio del 2003 por fiebre elevada, cefalea intensa y exantema generalizado con afectación de palmas y plantas. Esta especie también se ha identificado, mediante técnicas de PCR, en la sangre de otro paciente, con manifestaciones clínicas similares, procedente del País Vasco (Jado *et al.*, 2007).

3.4.1.8. Infección por *Rickettsia felis*. Tifus Murino. Pseudotifus de California.

En 1990 se detectó, mediante microscopía electrónica, la presencia de una rickettsia en *Ctenocephalides felis* (pulgas de gato) recogidas de zarigüeyas. Esta rickettsia fue inicialmente denominada “agente ELB” (EL Laboratory) (Adams *et al.*, 1990). Posteriormente, se ha conseguido su cultivo y su caracterización genética, y en la actualidad, se denomina *R. felis* y se encuentra incluida en el GFM (Radulović *et al.*, 1995; Bouyer *et al.*, 2001).

En 1994 *R. felis* fue implicada por primera vez en patología humana. Mediante técnicas de PCR se detectó en la sangre de un paciente de Texas que presentaba un cuadro clínico compatible con TM (Schriefer *et al.*, 1994b). Posteriormente, y también por PCR, se ha identificado en pacientes de Texas, Brasil, Yucatán (Méjico), Alemania, España y Taiwan (Zavala-Velázquez *et al.*, 2000; Raoult *et al.*, 2001b; Ritcher *et al.*, 2002b; Oteo *et al.*, 2006b; Tsai *et al.*, 2008; Zavala-Castro *et al.*, 2009). También se ha descrito un caso en Thai-Myanmar, ocho en Túnez, uno en Laos y otro en Francia, si bien el diagnóstico de todos estos casos se ha realizado por serología (Parola *et al.*, 2003, Znazen *et al.*, 2006; Phongmany *et al.*, 2006, Renvoisé *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha diagnosticado infección por *R. felis* en Israel, Kenia, Senegal y Suecia. Todos han sido confirmados por PCR (Ben-Zvi *et al.*, 2010, Richards *et al.*, 2010, Socolovschi *et al.*, 2010a, Lindblom *et al.*, 2010).

Recientemente se han publicado dos trabajos, uno de ellos llevado a cabo en Nueva Zelanda en el que se detectaron anticuerpos frente a *R. felis* en dos pacientes, y otro en Kenia, donde la detección se llevó a cabo por PCR (Lim *et al.*, 2012; Maina *et al.*, 2012).

Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, cefalea, exantema y, en los dos casos descritos en Alemania, escara en el punto de inoculación.

En España, *R. felis* ha sido identificada, mediante técnicas de PCR, en un elevado porcentaje de *C. felis* recogidas de gatos y perros de la provincia de Cádiz (Márquez *et al.*, 2002), y de La Rioja (Blanco *et al.*, 2006).

Mediante técnicas serológicas (MIF, absorción cruzada e Inmunoblot) ha sido detectada la presencia de este microorganismo en 5 de 44 pacientes con fiebre de duración intermedia en Canarias (Pérez-Arellano *et al.*, 2005). En todos los casos las manifestaciones clínicas fueron leves y en ninguno de ellos se observó la presencia de exantema. Aunque no lo han podido demostrar, los autores de estos hallazgos piensan que *R. felis* podría ser la responsable de algunos de los casos de TM diagnosticados en los últimos años en las Islas Canarias (Hernández-Cabrera *et al.*, 2004).

Por último, *R. felis* fue detectada mediante PCR en el suero de dos pacientes afectos de trombiculidiasis, con síndrome febril leve en La Rioja (Oteo *et al.*, 2006b).

3.4.1.9. Infección por *Rickettsia massiliae*

R. massiliae fue aislada por primera vez en 1992, en *R. sanguineus* recogidos en un área cercana a Marsella. Posteriormente, esta rickettsia se ha identificado, mediante técnicas de biología molecular, en *R. sanguineus* y en *Rhipicephalus turanicus* en Grecia, Portugal, Francia, España, Suiza, Sicilia, África central y Malí (Parola *et al.*, 2005). En 1996, se aisló una variante de *R. massiliae* en *R. sanguineus* recogidos en diferentes zonas de Cataluña. Esta “nueva variante” ha sido denominada Bar 29 y se ha sugerido que podría ser la responsable de algunos casos de FB en esa región española (Beati *et al.*, 1996).

Desde su aislamiento y hasta hace pocos años, *R. massiliae* ha sido incluida en el grupo de “rickettsias no patógenas para el hombre”. En enero de 2006 se comunicó el primer caso de infección humana por este microorganismo. *R. massiliae* se ha cultivado, e identificado mediante PCR, a partir del suero almacenado de un paciente que en 1985 presentó un cuadro de fiebre, exantema y escara, quedando así demostrada su implicación en patología humana (Vitale *et al.*, 2006). Posteriormente se ha detectado en pacientes en Francia y recientemente se ha diagnosticado, aquí en nuestro centro, en un paciente procedente de Argentina (Parola *et al.*, 2008; García-García *et al.*, 2010).

3.4.1.10. Fiebre africana por picadura de garrapata

La fiebre africana por picadura de garrapata es una rickettsiosis causada por *R. africae* y, transmitida por la picadura de las garrapatas *Amblyomma hebraeum* y *Amblyomma variegatum* en áreas rurales del África Subsahariana y en la isla de Guadalupe.

La seroprevalencia de la infección en la población general de estas zonas es alta: 30-56% (Dupont *et al.*, 1995; Kelly, 2006). Esto es debido al elevado porcentaje de garrapatas infectadas por *R. africae* (64-70%) (Dupont *et al.*, 1994; Dupont *et al.*, 1995), a la baja especificidad de hospedador del vector y a la gran actividad que tiene esta especie de garrapata (están activas las 24 horas del día) (Parola and Raoult, 2001).

En los últimos años, esta rickettsiosis ha sido descrita en distintos países de Europa, en EEUU y Japón, zonas en las que no existe el vector de la enfermedad. Todos los casos se producen en turistas que regresan de regiones endémicas (Fournier *et al.*, 1998b; Jensenius *et al.*, 1999; Raoult *et al.*, 2001a; Caruso *et al.*, 2002; Jensenius *et al.*, 2003a; Oteo *et al.*, 2004b; Jensenius *et al.*, 2006a; Roch *et al.*, 2008, Stephany *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009; Fujisawa *et al.*, 2012) y aparecen, típicamente, de forma agrupada.

La fiebre africana por picadura de garrapata se considera en nuestro país una rickettsiosis importada. Asimismo, y de forma ocasional, se han descrito en turistas y cooperantes casos de rickettsiosis con especies de rickettsia que no son las habituales en su medio (Portillo and Oteo, 2012).

La incidencia es mayor entre los meses de noviembre y abril. El periodo de incubación oscila entre 5 y 7 días, aunque puede prolongarse hasta 13 días.

La mayoría de los pacientes presentan fiebre elevada, acompañada de cefalea y artromialgias. La escara en el punto de inoculación es muy frecuente (95%) y en más de la mitad de los casos es múltiple (de 3 hasta 30 escaras). También es frecuente observar linfadenopatías regionales y linfangitis. El exantema aparece con menos frecuencia que en la FB y puede ser maculopapular, vesicular o purpúrico (Raoult and Roux, 1997). También se ha descrito la presencia de estomatitis aftosa de forma ocasional (Jensenius *et al.*, 2003b). Las complicaciones graves son raras y, hasta la fecha, no se ha descrito ningún caso de

evolución fatal. No obstante, es de destacar que, recientemente esta zoonosis ha sido relacionada con el desarrollo de cuadros neurológicos, como neuropatía periférica de curso subagudo y alteraciones neuropsiquiátricas (Jensenius *et al.*, 2006b).

El diagnóstico se debe sospechar en todo paciente que presente un cuadro clínico compatible y que haya viajado recientemente a zonas rurales del África Subsahariana o a la isla de Guadalupe.

En 2007, Portillo y cols. amplificaron *R. africae* en *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, además de en *A. hebraeum* retiradas de oryx de Bostwana, Sudáfrica (Portillo *et al.*, 2007).

Posteriormente se ha amplificado en tres especímenes de *Amblyomma loculosum* en Oceanía, pero no se han descrito casos en ese continente (Eldin *et al.*, 2011). Además, nuestro grupo ha detectado *R. africae* en un ejemplar de *Hyalomma aegyptium* (Gargili *et al.*, 2012).

3.4.2. Rickettsiosis del grupo tífus

Las rickettsiosis del grupo tífus constituyen un grupo de enfermedades causadas por *R. prowazekii* y por *R. typhi*, transmitidas por piojos y pulgas, respectivamente.

El inicio de ambas enfermedades suele ser brusco, con fiebre elevada, cefalea intensa y artromialgias. La disminución del nivel de conciencia y el estupor se consideran característicos de este grupo de zoonosis. En un porcentaje variable de casos aparece un exantema generalizado que, en su forma típica, respeta palmas y plantas (diferencia con las rickettsiosis del GFM). En la analítica se puede observar anemia normocítica normocrómica, leucopenia o leucocitosis, trombocitopenia, aumento de la VSG, discreto aumento de las transaminasas y proteinuria.

3.4.2.1. Tifus murino (TM)

El TM es una zoonosis de distribución universal causada por *R. typhi*.

Su prevalencia es mayor en regiones de clima templado y subtropical, donde son frecuentes su reservorio, las ratas (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*), y su vector, la pulga murina (*Xenopsilla cheopis*). Como ya se ha mencionado, en la actualidad se acepta la existencia de un nuevo ciclo biológico. Se ha demostrado que gatos y zarigüellas pueden actuar como reservorios de *R. typhi* y *C. felis* como vector. Estos hallazgos tienen una gran importancia epidemiológica, puesto que explicarían la existencia de casos de TM en países desarrollados, en donde las ratas y sus pulgas no son tan frecuentes. Por el contrario, existe una gran población de animales domésticos parasitados por *C. felis*, que tiene gran avidez por picar al ser humano y puede estar infectada por *R. typhi*.

Esta enfermedad es más frecuente entre los meses de abril y octubre y su periodo de incubación es de 1 a 2 semanas.

Los síntomas iniciales, en la mayoría de los casos, son totalmente inespecíficos (fiebre, cefalea, mialgias) y únicamente en un 18% de los casos aparece el exantema. Por el contrario, en el curso de la enfermedad este exantema, puede estar presente en más de la mitad de los casos. Generalmente, es de tipo macular o maculopapular y en raras ocasiones es de tipo petequial. Habitualmente es muy tenue, por lo que puede pasar desapercibido.

En general, las complicaciones son raras y la mortalidad baja. No obstante, en la única serie recogida en nuestro país se han descrito complicaciones graves, sobre todo fracaso renal agudo, hasta en el 13% de los pacientes (Hernández-Cabrera *et al.*, 2004).

La infección por *R. typhi* es una causa importante de fiebre de duración intermedia en Andalucía (Bernabeu-Wittel *et al.*, 1999) y ocasionalmente en el norte de España (Oteo, 2010).

3.4.3. Situación en España

Hasta hace pocos años, en España únicamente se habían descrito dos rickettsiosis, la FB y el TM.

La FB es la rickettsiosis más frecuente en nuestro país y, en algunas zonas constituye una de las zoonosis más prevalentes.

Desde las primeras descripciones de la enfermedad, a principios del siglo pasado, se han publicado numerosas series de pacientes (Font-Creus *et al.*, 1985; Martín-Farfán *et al.*, 1985; Jufresa *et al.*, 1997; Anton *et al.*, 2003), y se han llevado a cabo numerosos estudios seroepidemiológicos y de vectores en distintas regiones de España (Herrero *et al.*, 1993; Saz *et al.*, 1993; Oteo *et al.*, 1996; Segura-Porta *et al.*, 1998; Fernández-Soto *et al.*, 2003). Asimismo, se han realizado importantes aportaciones para su tratamiento (demostración de la eficacia de pautas cortas de doxiciclina y de otros antibióticos) (Bella *et al.*, 1990). En la inmensa mayoría de los casos, el diagnóstico de FB se ha basado en la serología y, en escasas ocasiones, se ha aislado su agente causal, *R. conorii*. Hasta hace poco tiempo, únicamente se había conseguido su aislamiento, mediante cultivo en shell-vial, a partir de la sangre de dos pacientes procedentes de Cataluña. Estas dos cepas aisladas se identificaron genotípicamente mediante secuenciación de un fragmento del gen *ompA*. Las dos cepas eran idénticas entre sí y sus secuencias eran homólogas en un 100% a *R. conorii* subsp. *conorii* cepa Malish 7 (Cardeñosa *et al.*, 2000). En la actualidad, en nuestro centro ya disponemos de cepas de *R. conorii* subsp. *conorii* aisladas mediante cultivo celular a partir de la sangre de un paciente con FB. En los últimos años, algunos autores han sugerido que muchos de los casos de FB diagnosticados en nuestro país podrían estar causados por especies de rickettsias diferentes a *R. conorii*, como puede ser el caso de la infección por *R. monacensis*. Esta rickettsia fue aislada por primera vez a partir de la sangre de un paciente procedente de La Rioja Baja, lo que supuso su implicación como agente patógeno a nivel mundial (Jado *et al.*, 2007).

En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido la implicación de diferentes especies de rickettsia en patología humana. Así, gracias a la PCR se han amplificado, además de *R. conorii*, *R. felis*, *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. slovacae*, *Candidatus R. rioja*, *R. africae* y

R. massiliae en las muestras clínicas de pacientes con sospecha de rickettsiosis. Estas dos últimas rickettsias se amplificaron en muestras clínicas de turistas.

Respecto al TM, éste ha sido descrito en el sur de España como causa frecuente de cuadros febriles de duración intermedia (7% de 926 pacientes evaluados). Más recientemente, se ha constatado su presencia en Tenerife (32 casos en 4 años). El diagnóstico de todos los pacientes se ha realizado mediante técnicas serológicas y en ningún caso se ha aislado el agente etiológico (Bernabeu-Wittel *et al.*, 1999; Miguélez *et al.*, 2003).

Como ya se ha comentado, se ha detectado la presencia de *R. felis* en 5 pacientes procedentes de las Islas Canarias. Estos pacientes presentaban un cuadro febril de duración intermedia sin exantema, y el diagnóstico de infección por *R. felis* se realizó, en todos los casos, mediante técnicas serológicas (Pérez-Arellano *et al.*, 2005).

En 2005 nuestro grupo consiguió identificar este microorganismo mediante PCR en dos pacientes. Ambos acudieron a la consulta por presentar malestar general, artralgias y exantema papular pruriginoso en tórax, abdomen y extremidades inferiores, acompañado en uno de los casos de fiebre. Este cuadro clínico se había iniciado tras la estancia en una zona boscosa del noroeste de La Rioja (Alto de Piqueras), y ambos pacientes presentaban, además, parasitación por larvas de trombicúlidos (*Neotrombicula* spp.). A partir de la sangre de los dos pacientes se ha conseguido la amplificación de los fragmentos de los genes *ompA*, *ompB* y *gltA*. Las secuencias han mostrado un 100% de identidad con las de los mismos genes de *R. felis*. En ninguna de las larvas de trombicúlidos recogidas de los pacientes se identificó ADN de *Rickettsia* spp. (Oteo *et al.*, 2006b).

Las rickettsiosis diagnosticadas en España se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Rickettsiosis diagnosticadas en España.

	Enfermedad	Microorganismo	Vector
AUTÓCTONAS	Fiebre botonosa	<i>Rickettsia conorii</i>	Complejo <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
	Fiebre botonosa-like	<i>Rickettsia monacensis</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
	DEBONEL/TIBOLA	<i>Rickettsia slovaca</i> C. <i>Rickettsia rioja</i> <i>Rickettsia raoultii</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>
	Tifus murino	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> <i>Ctenocephalides canis</i>
	Tifus murino	<i>Rickettsia typhi</i>	<i>C. felis?</i>
	LAR	<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i>	<i>Hyalomma</i> spp.
	IMPORTADAS	Fiebre africana por picadura de garrapata	<i>Rickettsia africae</i>
Innominada		<i>Rickettsia massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>

DEBONEL/TIBOLA: Linfadenopatía, eritema y necrosis transmitida por *Dermacentor* / Linfadenopatía transmitida por garrapatas, LAR: Linfangitis asociada a rickettsiosis, C.: *Candidatus*

Además, en los artrópodos vectores se han identificado, mediante técnicas de biología molecular las especies de rickettsia que aparecen en la tabla 11.

Tabla 11. Especies de rickettsias identificadas en artrópodos en España.

<i>Rickettsia</i> spp.	Vector	Áreas geográficas
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>Hyalomma marginatum</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Rhipicephalus bursa</i> <i>Rhipicephalus turanicus</i> <i>Haemaphysalis punctata</i> <i>Haemaphysalis inermis</i>	La Rioja Castilla-León
<i>Rickettsia hoogstralii</i>	<i>H. punctata</i> <i>Haemaphysalis sulcata</i>	La Rioja
<i>Rickettsia massiliae</i> /Bar 29	<i>R. sanguineus</i> <i>R. turanicus</i>	Cataluña La Rioja Castilla-León Andalucía
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Castilla-León Andalucía La Rioja
<i>Rickettsia felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> <i>Ctenocephalides canis</i>	Cádiz La Rioja Islas Canarias
<i>Rickettsia monacensis</i> (incluida la cepa <i>R. IRS3/IRS4</i> y el Agente Cádiz)	<i>I. ricinus</i> <i>Dermacentor marginatus</i>	La Rioja Castilla-León Andalucía
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>R. sanguineus</i> <i>R. bursa</i>	La Rioja
<i>Rickettsia raoultii</i>	<i>D. marginatus</i> <i>Dermacentor reticulatus</i>	Jaén La Rioja Castilla-León Galicia Cantabria Andalucía
<i>Rickettsia slovacica</i>	<i>D. marginatus</i>	Andalucía La Rioja Cataluña Castilla-León Comunidad Valenciana

<i>Rickettsia</i> spp.	Vector	Áreas geográficas
<i>Candidatus Rickettsia rioja</i>	<i>D. marginatus</i>	La Rioja Galicia Castilla León Cataluña
<i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	<i>I. ricinus</i>	La Rioja
<i>Candidatus Rickettsia vini</i>	<i>I. ricinus</i> <i>Ixodes arboricola</i>	La Rioja

3.5. DIAGNÓSTICO DE LAS RICKETTSIOSIS

El diagnóstico de las rickettsiosis se basa fundamentalmente en la observación de unas manifestaciones clínicas compatibles, asociadas a unas determinadas características epidemiológicas.

Como ya se ha comentado, algunas de las rickettsiosis como la FMMR y el TE, y en menor grado la FB, tienen una mortalidad elevada, y esta mortalidad está íntimamente relacionada con la demora en el diagnóstico y con el retraso en el inicio del tratamiento. En el resto de las rickettsiosis, el tratamiento evita la aparición de complicaciones y acorta la duración de la sintomatología (Raoult *et al.*, 1986; Walker, 1990). Por lo tanto, ante la sospecha clínica de una infección por rickettsias, se debe iniciar siempre el tratamiento antibiótico, sin esperar a la confirmación microbiológica.

El crecimiento de las rickettsias en los medios de cultivo celulares convencionales, que permitiría un diagnóstico definitivo de la infección, es lento, laborioso y sólo se puede realizar en laboratorios con medidas de bioseguridad adecuadas. Las técnicas serológicas son los métodos más utilizados para el diagnóstico de las infecciones provocadas por microorganismos de difícil cultivo. Estos métodos tienen el inconveniente de que no detectan los anticuerpos hasta que no han transcurrido un mínimo de dos semanas desde el inicio de la enfermedad, y que no permiten un diagnóstico certero a nivel de especie (Teyssere and Raoult, 1992).

En los últimos años, la incorporación de la biología molecular a la rutina de los laboratorios ha hecho de la PCR una herramienta muy útil para apoyar el diagnóstico de estas infecciones.

3.5.1. Técnicas diagnósticas directas

3.5.1.1. Cultivo

El aislamiento de rickettsias en medios de cultivo a partir de diferentes muestras (sangre, plasma y muestras de biopsias) permite confirmar el diagnóstico de rickettsiosis y, al igual que en el resto de las enfermedades infecciosas, es el “gold standard”.

- **Cultivo convencional:** El crecimiento de las rickettsias en estos medios es lento y laborioso y, por lo tanto, no es un método diagnóstico de aplicación rutinaria. La muestra más rentable para esta técnica es la sangre total heparinizada, aunque también se puede utilizar la capa leucocitaria. Los cultivos pueden realizarse en animales de laboratorio, siendo los más adecuados el cobaya y el ratón. Otra posibilidad son los huevos embrionados y las líneas celulares, como las líneas MRC5 (fibroblastos embrionarios pulmonares humanos), Vero (células epiteliales de mono), Hela (células cancerosas humanas), y L-929 (fibroblastos de ratón). Además, se ha llevado a cabo, con gran efectividad, el crecimiento de rickettsias en líneas celulares de artrópodos (Holman and Ronald, 1980; Bell-Sakyi 1991; Kurtii *et al.*, 1993, Munderloh *et al.*, 1994).
- **Cultivo celular rápido (centrifugación en shell-vial):** El shell-vial es una adaptación de las técnicas de cultivos celulares. Es un método sencillo y aplicable en muchos laboratorios, ya que no es necesario preparar líneas celulares. En este caso, las células van incluidas en los tubos comercializados de Shell-vial. La técnica se basa en la centrifugación de las muestras clínicas sobre monocapas celulares, y la detección de las rickettsias en las mismas tras cortos periodos de incubación (3-5 días). Las ventajas más importantes que aporta esta técnica respecto a los cultivos convencionales son: el aumento de la sensibilidad por la centrifugación de la muestra (ya que ésta facilita la

entrada de las rickettsias en la célula); la inoculación de igual volumen de muestra en una superficie más pequeña; y la disminución del índice de contaminantes. También resulta menos peligroso para el personal que manipula las muestras. Además, el cultivo puede ser positivo a los tres días de la inoculación (Marrero and Raoult, 1989). La muestra más utilizada es la sangre completa heparinizada, si bien mediante esta técnica también se pueden detectar rickettsias a partir de biopsias de piel. En estas últimas las posibilidades de contaminación son mayores, ya que no se trata de muestras estériles. No obstante, para muchos autores constituyen las muestras más rentables (Vestris *et al.*, 2003).

Una vez aisladas las rickettsias en los medios de cultivo, se debe proceder a la identificación a nivel de especie mediante:

- MIF con antisuero policlonal y/o monoclonal de ratón, ha constituido el método de referencia para la identificación de rickettsias, aunque tiene dos inconvenientes importantes: la existencia de reacciones cruzadas y la laboriosidad.
- Técnicas de biología molecular, sobre todo la secuenciación de los productos amplificados mediante PCR, que se expondrán detalladamente más adelante.

En general, la sensibilidad del cultivo es baja y disminuye cuando las muestras se obtienen una vez iniciado el tratamiento antibiótico o cuando, una vez obtenidas, se demora su procesamiento. Además, es una técnica lenta, ya que en muchas ocasiones es necesario esperar semanas para disponer de los resultados. Por estos motivos, el cultivo no se utiliza habitualmente en la práctica clínica y sólo se utiliza con fines de investigación o en centros de referencia.

La obtención de un cultivo puro del microorganismo es fundamental para la investigación de las infecciones producidas por rickettsias, ya que nos permite la producción de antígenos específicos para estudios serológicos; la producción de anticuerpos específicos para la inmunodetección; la disponibilidad de ADN purificado para estudios genéticos; la descripción de la cepa con fines taxonómicos; el estudio “in vitro” de la sensibilidad antibiótica; y el diseño de

modelos experimentales (La Scola and Raoult, 1996; Cardeñosa *et al.*, 1997; Birg *et al.*, 1999; Sekeyova *et al.*, 2001).

3.5.1.2. Observación directa

La detección de rickettsias mediante tinciones en sangre o en muestras de tejidos también permite confirmar el diagnóstico de la infección.

Las rickettsias se pueden observar al microscopio mediante las tinciones de Giemsa y Giménez. Estas técnicas son poco sensibles y poco específicas. En la actualidad se utilizan métodos de inmunofluorescencia. Las muestras a estudiar se fijan con formalina y parafina y se tiñen con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína, dirigidos contra el lipopolisacárido de las rickettsias. Existe la posibilidad de realizar variantes con enzimas (inmunoperoxidasa).

Las muestras más rentables son las biopsias cutáneas de las lesiones, sobre todo de la escara de inoculación, ya que en esta lesión el número de microorganismos es elevado. La especificidad de esta técnica es del 100% y la sensibilidad varía de un 50 a un 70%, dependiendo de la correcta recogida de la muestra y de la toma previa de antibióticos por parte del paciente (Cardeñosa *et al.*, 1997).

Para el diagnóstico de la FB también se ha utilizado un método de detección directa de *R. conorii* en células endoteliales circulantes. Estas células se separan mediante perlas magnéticas revestidas con un anticuerpo monoclonal dirigido frente a antígenos de superficie de células endoteliales humanas. La presencia de las rickettsias se pone de manifiesto tras una incubación con un suero monoclonal anti-*Rickettsia* y un conjugado fluorescente. Esta técnica tiene una sensibilidad del 50% y en los resultados no influye el tratamiento antibiótico previo. Otra de sus ventajas es el valor pronóstico, ya que el número de células endoteliales circulantes aumenta con la severidad de la infección. Tiene el inconveniente de estar limitada por el número de dichas células y por la rapidez de su degradación (La Scola and Raoult, 1996).

3.5.1.3. Técnicas de biología molecular

La amplificación de fragmentos de distintos genes de las rickettsias mediante técnicas de PCR permite un diagnóstico rápido de la enfermedad.

La técnica de la PCR se utiliza en microbiología clínica para la detección de microorganismos cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. Este método está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN, utilizando una cadena simple como molde, mediante la sucesión de ciclos de distinta temperatura. En la PCR se utilizan dos cebadores (iniciadores o “primers”) u oligonucleótidos sintéticos pequeños (15-30 bases de longitud), de polaridad opuesta y complementarios a los extremos 3' de la región que se quiere amplificar. El proceso básico se desarrolla en tres pasos: desnaturalización o separación de las hebras de ADN; apareamiento o unión de los cebadores a sus hebras complementarias; y extensión de la hebra complementaria a partir del cebador respectivo. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana a amplificar. Este proceso cíclico se lleva a cabo en un termociclador, y el ADN así obtenido se carga posteriormente en un gel de agarosa y se puede visualizar por tinción con bromuro de etidio.

Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de los ácidos nucleicos.

Para el estudio de las rickettsiosis las muestras más utilizadas son la sangre total, el suero y las biopsias de las lesiones cutáneas. La sangre debe ser tratada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o con citrato sódico y no con heparina, ya que ésta inhibe la PCR. Los mejores resultados se obtienen a partir de lesiones cutáneas (exantema y sobre todo escara de inoculación, lugares en los que la concentración de microorganismos es más elevada). En los últimos años también se han conseguido muy buenos resultados a partir de hisopos (Bechah *et al.*, 2011; Mouffok *et al.*, 2011; Renvoisé *et al.*, 2012).

Estas técnicas son sensibles y específicas y su sensibilidad disminuye cuando la recogida de las muestras se realiza una vez iniciado el tratamiento antibiótico. La

principal limitación de estos métodos es la posible existencia de contaminaciones y la presencia de inhibidores en las muestras clínicas.

En la actualidad, se conoce la secuencia completa del genoma de 14 especies de rickettsia. Estos conocimientos tienen gran importancia, ya que además de proporcionar dianas más sensibles y específicas para el diagnóstico molecular, permitirán un mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos.

Actualmente, los genes más utilizados para la identificación y caracterización de estos microorganismos son los que codifican la síntesis de: ARNr 16S (*rrs*), enzima citrato sintasa (*gltA*), proteína PS120 (gen *D*), y proteínas de superficie de 17 kDa, 120kDa (rOmpB) y 190kDa (rOmpA). Los cinco primeros son comunes a todas las especies de rickettsias y el gen que codifica la síntesis de rOmpA únicamente se encuentra en las rickettsias del GFM. La detección de, al menos, dos fragmentos de cualquiera de estos genes mediante PCR permite realizar el diagnóstico de rickettsiosis.

Una vez que hemos detectado la presencia de ADN de rickettsias en la muestra, la diferenciación de especies se puede realizar mediante diferentes técnicas. Las primeras técnicas utilizadas fueron las de PCR-RFLPs. En ellas los productos amplificados mediante la PCR se digieren con determinadas enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de ADN que cortan, dando lugar a una serie de bandas. Los perfiles de las bandas así obtenidos se comparan con los de las cepas de referencia depositados en distintas bases de datos. Estas técnicas comenzaron a utilizarse para el estudio de las rickettsias en 1991 (Regnery *et al.*, 1991) y permiten una gran aproximación en la identificación de especies. Numerosos estudios han demostrado que son métodos sensibles y reproducibles y se consideran válidos para la diferenciación de especies de una forma rápida y sencilla (Eremeeva *et al.*, 1994a).

No obstante, en la actualidad, el desarrollo de secuenciadores automatizados permite la secuenciación de estos fragmentos de genes y una identificación de las distintas especies de rickettsias mucho más exacta que la obtenida con RFLPs. Así, la secuenciación se considera la técnica de elección tanto para el diagnóstico de las distintas rickettsiosis como para la identificación de nuevas especies de rickettsias.

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se compara con las secuencias depositadas en bases de datos. Actualmente, existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de Internet, como GenBank NCBI, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), y otras privadas.

La rentabilidad de este método depende en gran parte del gen elegido para la amplificación. El fragmento ideal para amplificar y secuenciar sería aquel que tuviera regiones muy conservadas y comunes a todas las especies de rickettsias (por lo tanto permitiría la detección de todas ellas) y regiones lo suficientemente variables como para permitir la diferenciación de las distintas especies.

El gen que codifica el ARNr 16S fue el primer gen secuenciado del genoma de las rickettsias y, como se ha comentado, se ha utilizado para la identificación a nivel de género. Sin embargo, dado que su secuencia es muy similar en todas las especies (97,2-99,9% de similitud), no se considera válido para su diferenciación, lo mismo que el gen *htrA* (Roux and Raoult, 1999a).

En el gen que codifica la enzima citrato sintasa (*gltA*) existe un fragmento de 381 pb con secuencias específicas de especie de muchas de las rickettsias (aunque no permite diferenciar todas), siendo en la actualidad uno de los más utilizados para su identificación (Roux *et al.*, 1997).

El gen que codifica la síntesis de la proteína de superficie rOmpA posee unos fragmentos de 631 y de 532 pb lo suficientemente variables para permitir la distinción entre la mayoría de las especies (Fournier *et al.*, 1998a). Como ya se ha comentado, este gen únicamente está presente en las rickettsias del GFM; por lo tanto, no se puede utilizar para la identificación de rickettsias del GT y, además, no se ha conseguido la amplificación de dicho gen en *R. akari*, *R. helvetica*, *R. bellii*, *R. australis*, *R. canadensis*.

El gen que codifica rOmpB también posee fragmentos variables que permiten la diferenciación de especies y tiene la ventaja de estar presente en los dos grupos de rickettsias (GFM y GT), aunque no se ha conseguido la detección del gen *ompB* en *R. bellii* ni *R. canadensis* (Roux and Raoult, 2000).

Por último, en el gen D, que codifica la síntesis de la proteína 120PS, existe una región de 3.030 pb que permite la diferenciación de la mayoría de las especies (Sekeyova *et al.*, 2001).

La PCR anidada (nested PCR), permite aumentar la sensibilidad de la PCR convencional. En esta técnica se realizan dos amplificaciones consecutivas, utilizando cebadores distintos en cada una de ellas. El producto de la primera amplificación se utiliza como diana de la segunda, y los cebadores empleados en esta última son complementarios a la secuencia interna del fragmento previamente amplificado. El principal inconveniente de esta técnica es que a la vez que aumenta la sensibilidad, aumenta el riesgo de contaminación.

Con el fin de disminuir este riesgo y de aumentar la especificidad, Raoult y cols. han descrito una nueva modalidad de PCR que denominan “PCR suicida”. Consiste en la utilización de una determinada secuencia diana únicamente una vez, con lo que es imposible la contaminación (Fournier and Raoult, 2004).

En los últimos años, también se ha utilizado la PCR a tiempo real o PCR cuantitativa para la detección de rickettsia en muestras clínicas (Richards *et al.*, 2010; Socolovschi *et al.*, 2010a; Nilsson *et al.*, 2010). Esta variante de la PCR permite amplificar y a la vez cuantificar de manera absoluta el producto de la reacción.

Por último, la hibridación inversa en fase sólida (reverse line blotting: RLB) es un sistema combinado de hibridación y PCR que presenta varias ventajas. Es una técnica muy sensible y específica y, además, permite analizar de forma no radiactiva múltiples sondas en un solo ensayo. En este método, los productos de amplificación, marcados con biotina (mediante el uso de cebadores marcados) se hibridan en una única reacción con sondas específicas de distintas especies que han sido inmovilizadas en paralelo en una membrana de nylon. La detección del “producto de PCR-sonda” se lleva a cabo mediante una reacción quimioluminiscente. Así, la combinación de una PCR multiplex, diseñada para detectar microorganismos de diferentes géneros y/o especies en una muestra, y la posterior hibridación de dichos amplicones con sondas especie-específicas, permitiría la diferenciación simultánea de varias especies relacionadas.

3.5.2. Técnicas diagnósticas indirectas: Métodos serológicos

La confirmación diagnóstica de las rickettsiosis se realiza habitualmente mediante técnicas serológicas.

Como ya se ha comentado, estos métodos no permiten el diagnóstico en los estadios iniciales de la enfermedad y, por lo tanto, no aportan ninguna ayuda a la hora de decidir el tratamiento. Otro inconveniente de estas técnicas es la existencia de reacciones cruzadas entre especies del mismo y de diferentes grupos e, incluso, entre microorganismos de diferentes géneros. Así, se han demostrado reacciones cruzadas entre *Rickettsia* spp. y *Legionella* spp. (Raoult and Dasch, 1995). Por lo tanto, en muchas ocasiones, los métodos serológicos tampoco permiten realizar un diagnóstico etiológico definitivo.

- **Reacción de Weil Félix:** La primera técnica serológica utilizada fue la Reacción de Weil Félix o test de aglutinación. En 1915, Weil y Félix observaron que los sueros de pacientes con rickettsiosis poseían la capacidad de aglutinar ciertas cepas de *Proteus vulgaris*. Los antígenos de *P. vulgaris* OX-2 reaccionan con sueros de pacientes infectados por todas las especies de rickettsias del GFM, excepto por *R. rickettsii*. Los antígenos de *P. vulgaris* OX-19 reaccionan con sueros de pacientes infectados por rickettsias TG y por *R. rickettsii*. Los antígenos de *Proteus mirabilis* OX-K aglutinan con el suero de pacientes infectados por *O. tsutsugamushi* y los pacientes infectados por *R. akari*, generalmente, no desarrollan anticuerpos aglutinantes detectables con esta técnica. Los anticuerpos detectados mediante esta reacción son de tipo IgM y aparecen entre el quinto y décimo día de la enfermedad. Durante mucho tiempo, se pensó que en la enfermedad de Brill-Zinsser no se producían anticuerpos IgM y que, por lo tanto, este test era negativo. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado la presencia de anticuerpos IgM aglutinantes contra lipopolisacáridos de *P. vulgaris* (Eremeeva *et al.*, 1994b). Debido a que, tanto la sensibilidad como la especificidad de este método son muy bajas, en la actualidad, esta técnica sólo se utiliza en países con pocos recursos económicos (La Scola and Raoult, 1997).

- **Fijación del complemento:** Para esta técnica se utilizan antígenos específicos de grupo extraídos de sacos vitelinos infectados con *Rickettsia* spp. Los resultados son variables, dependiendo de la fuente y del método de producir los antígenos y de la cantidad de antígeno utilizada. Además, es una técnica muy compleja, poco sensible y poco específica (La Scola and Raoult, 1997).
- **Hemaglutinación indirecta:** Con este método se detectan anticuerpos contra antígenos eritrocitarios, sensibilizados en fresco o fijados en glutaraldehído. Pone de manifiesto tanto la existencia de anticuerpos IgG como IgM, si bien, la aglutinación es más eficaz con anticuerpos de la clase IgM. Es una técnica muy sensible para el diagnóstico, ya que los títulos más elevados se detectan durante la fase aguda. Por el contrario, durante la fase de convalecencia se detectan títulos de anticuerpos muy bajos (La Scola and Raoult, 1997).
- **Agglutinación en látex:** Este test se basa en la detección de anticuerpos contra antígenos sensibilizados en perlas de látex. Pone de manifiesto la presencia de anticuerpos IgG e IgM. Es una técnica muy rápida (se obtiene el resultado en aproximadamente 15 minutos) y sencilla de realizar. Posee una elevada especificidad de grupo y una sensibilidad similar a la MIF. Su principal inconveniente es su elevado coste (La Scola and Raoult, 1997).
- **ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas):** Esta técnica permite diferenciar entre anticuerpos de tipo IgG e IgM. Tiene una sensibilidad y especificidad similar a la MIF, si bien es más sensible que ésta para la detección de niveles bajos de anticuerpos (tras vacunación o durante la fase de convalecencia). Estas características y la ausencia de subjetividad, hacen del ELISA una técnica especialmente útil para la realización de estudios seroepidemiológicos (La Scola and Raoult, 1997; Vestris *et al.*, 2003).
- **MIF:** En la actualidad, constituye la técnica serológica de elección para el diagnóstico de las rickettsiosis. Consiste en la fijación del antígeno a un porta que, posteriormente, se enfrenta con el suero del paciente a diferentes diluciones. A continuación, se pone en contacto con el conjugado

(antiinmunoglobulina humana marcada con fluoresceína) y se observa en el microscopio de fluorescencia. Permite la detección de anticuerpos IgG y/o IgM. Los anticuerpos de tipo IgM comienzan a detectarse al final de la primera semana y los de tipo IgG al final de la segunda semana. Es importante destacar que con esta técnica se puede producir el fenómeno de prozona (ausencia de reacción inmune cuando hay altas concentraciones de anticuerpos). Este método es sensible y específico y su principal inconveniente es la existencia de reacciones cruzadas entre las especies más afines dentro de cada grupo (La Scola and Raoult, 1997; Cardeñosa *et al.*, 1997; Santibañez *et al.*, 2006). No obstante, algunos estudios han demostrado que, a pesar de esto, los títulos frente a la especie responsable de la enfermedad, en la mayoría de los casos, son muy superiores a los detectados frente al resto de las especies (La Scola *et al.*, 2000). Para el diagnóstico de rickettsiosis es necesario demostrar una seroconversión o un aumento de 4 veces el título entre la fase aguda y la fase de convalecencia. La Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Grupo de Estudio de Enfermedades Infecciosas para *Coxiella*, *Rickettsia*, *Anaplasma* y *Bartonella* (ESCAR) en las “Guías para el diagnóstico de enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas en Europa” ha propuesto considerar positivos títulos de IgG ≥ 128 y/o IgM ≥ 64 en caso de infección por *R. conorii*. Títulos de IgG ≥ 64 y/o IgM ≥ 32 en las infecciones por el resto de las especies (Brouqui *et al.*, 2004). Las guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) consideran positivo un suero con un título único ≥ 40

(www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia)

Para minimizar el riesgo de reacciones cruzadas los ensayos de MIF se pueden realizar junto con ensayos de absorción cruzada.

- **Absorción cruzada:** La absorción cruzada es también una técnica confirmatoria. Permite identificar la especie responsable de la enfermedad. Si la absorción del suero se realiza con el agente etiológico, desaparecen los títulos de anticuerpos de todas las especies (homólogos y heterólogos). Por el contrario, si la absorción se realiza con las especies causantes de las reacciones cruzadas desaparecen solamente los anticuerpos homólogos. Para

esta técnica también se precisan grandes cantidades de antígenos y sólo está disponible en Laboratorios de Referencia.

- **Inmunoperoxidasa:** Esta técnica es muy similar a la MIF. La única diferencia es que se utiliza una enzima, la peroxidasa, en vez de la fluoresceína.
- **Inmunoblot:** El Inmunoblot, también llamado Western blot, se utiliza como técnica de confirmación. Es un método altamente específico, ya que determina la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos de las rickettsias separados en un gel de poliacramida. Su principal inconveniente es que se necesitan grandes cantidades de antígeno purificado. Estos antígenos no están comercializados, por lo que esta técnica sólo se realiza en Laboratorios de Referencia. Las principales ventajas de la técnica son: la posibilidad de detectar los anticuerpos precozmente (antes que con la MIF), y la ausencia de reacciones cruzadas entre las distintas especies. Así, en el caso de la FB, se detectan anticuerpos IgM contra el antígeno lipopolisacárido de forma más precoz que con la MIF.

En resumen, la MIF es la técnica serológica de elección para el diagnóstico de las rickettsiosis. Es una prueba sensible y detecta la presencia de anticuerpos al final de la primera semana (del inicio de los síntomas) en la mayoría de las infecciones provocadas por *Rickettsia* spp. La inmunoperoxidasa podría constituir una alternativa válida en aquellos laboratorios que no disponen de inmunofluorescencia. No obstante, se necesitan más estudios para recomendar su utilización. La aglutinación en látex también posee una elevada sensibilidad y además es rápida y sencilla de realizar. El principal inconveniente para considerarla como técnica de elección es su elevado coste. Para los estudios de seroprevalencia, por el contrario, se deben exigir técnicas muy específicas y, aunque la MIF se podría utilizar con este fin, el método más aconsejable es el inmunoblot (La Scola and Raoult, 1997; Brouqui *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Objetivos

Los objetivos del trabajo que se describen en esta memoria fueron:

1. Determinar la sensibilidad de diferentes métodos de PCR (genes *ompA*, *ompB*, *gltA*, *htrA* y ARNr 16S) aplicados al diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas.
2. Establecer la validez de diferentes métodos de PCR (genes *ompA*, *ompB*, *gltA*, *htrA* y ARNr 16S) para la identificación de *Rickettsia* spp. en las muestras clínicas de pacientes con diagnóstico de rickettsiosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS ESTUDIADAS

De un total de 1.276 muestras recibidas, desde enero de 2.003 hasta diciembre de 2.008, en el Centro de Rickettsiosis y Enfermedades transmitidas por Artrópodos Vectores del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), adscrito al Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro de Logroño, se seleccionaron 72 muestras clínicas (sangre con EDTA, suero, biopsias y garrapatas) correspondientes a 52 pacientes con diagnóstico de rickettsiosis.

Todas las muestras clínicas debían de cumplir los siguientes criterios:

1. Muestras en fase aguda de la enfermedad y extraídas previas a la toma de antibióticos.
2. Muestras que hubieran llegado a nuestro laboratorio en condiciones óptimas de temperatura y tiempo (refrigeradas y en las 24 horas siguientes a la extracción o, congeladas si hubiera pasado más de un día desde que fueron tomadas).
3. Muestras en las que se hubiera amplificado *Rickettsia* spp. mediante alguno de los métodos de PCR que se detallan a continuación.

Además, se procesaron 18 garrapatas retiradas de pacientes asintomáticos en las que se había constatado la presencia de *Rickettsia* spp. mediante uno de los ensayos de PCR que se detallan en el punto 2.6.

2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1. Centrifugación de la sangre

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos “vacutainer” tratados con EDTA como anticoagulante. Previo a la centrifugación se separó una alícuota de 1 mL. El resto de la muestra se centrifugó 10 minutos a 3.000 rpm y se prepararon alícuotas separando el plasma, la capa leucocitaria y la capa eritrocitaria.

El tubo de sangre del que se obtuvo el suero también se centrifugó 10 minutos a 3.000 rpm, permitiendo que el suero se quedara en la parte superior del tubo, obteniéndose así alícuotas de suero.

El proceso de preparación de alícuotas se realizó en una campana de bioseguridad nivel II bajo estrictas condiciones de esterilidad.

De todos los pacientes que fue posible, se reservó una alícuota de 200 µL de sangre completa con EDTA, de plasma, de la capa leucocitaria, de la capa eritrocitaria y de suero en fase aguda para extraer el ADN. Del tubo de suero, se separaron además, 200 µL para la realización de técnicas serológicas. Los tubos de suero obtenidos en la fase de convalecencia (entre 2 y 6 semanas después del inicio de la enfermedad) se centrifugaron del mismo modo que los anteriores y se emplearon para estudiar una posible seroconversión o serorrefuerzo. El resto de muestras se congelaron a -80°C.

2.2. Preparación de las biopsias

Las biopsias se extrajeron en condiciones estériles mediante la técnica de sacabocados (punch) de la zona de la escara. La biopsia se dividió en dos mitades en campana de seguridad biológica. Una de ellas se congeló a -80°C, y la otra se trituró con ayuda de un bisturí estéril, y se reservó para la extracción del ADN.

2.3. Retirada e identificación de las garrapatas

Si la garrapata permanecía fijada al paciente, se retiró mediante tracción con pinzas finas. La zona de la picadura se desinfectó con povidona yodada. En otros

casos, las garrapatas ya habían sido retiradas por los propios pacientes, bien manualmente o aplicando previamente aceite antes de acudir a la consulta.

Las garrapatas se clasificaron taxonómicamente en el laboratorio mediante una lupa y mediante el uso de claves (Manilla, 1998; Estrada-Peña, 2000). En el caso de las garrapatas que se encontraban en mal estado, la identificación se llevó a cabo mediante biología molecular, empleando una PCR que amplifica un fragmento de 456 pb del gen ARNr 16S de garrapatas (Black and Piesman, 1994). En el caso de las garrapatas del género *Rhipicephalus* se llevó a cabo, además otra reacción de PCR del gen ARNr 12S mitocondrial (Beati y Keirans, 2001). En las siguientes tablas se detallan las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR para la identificación molecular de las garrapatas (tablas 12 y 13).

Tabla 12. Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR empleados para la identificación molecular de garrapatas mediante la detección del gen ARNr 16S.

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones
16S+1: CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG 16S-1: CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	92°C 1 min 48°C 1 min 72°C 1.5 min } 10 ciclos
	92°C 1 min 54°C 35 seg 72°C 1.5 min } 32 ciclos
	72°C 7 min 1 ciclo

Tabla 13: Secuencia de los cebadores y condiciones de PCR empleados para la identificación molecular de garrapatas del género *Rhipicephalus* mediante la detección del gen ARNr 12S mitocondrial.

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones
T1B: AAAGTAGGATTAGATACCCT T2A: AATGAGAGCGACGGGCGATGT	94°C 5 min 1 ciclo
	94°C 15 seg
	51°C 30 seg 5 ciclos
	68°C 30 seg
	94°C 15 seg
	53°C 30 seg 25 ciclos
	70°C 30 seg
70°C 5 min 1 ciclo	

Una vez que las garrapatas estuvieron identificadas, se cortaron longitudinalmente. Media garrapata se congeló a -80°C. La otra mitad se trituró con un bisturí estéril y se reservó para la extracción del ADN. Si se trataba de garrapatas alimentadas, una vez trituradas, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) estéril antes de comenzar la extracción del ADN.

2.4. Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de sangre completa con EDTA, plasma, capa leucocitaria, eritrocitos, suero, biopsias y garrapatas. En función de la muestra se utilizaron los siguientes protocolos para la extracción del ADN:

- Protocolo para la extracción de ADN de sangre y fluidos corporales (sangre completa con EDTA, plasma, capa leucocitaria, eritrocitos y suero) mediante el kit comercial QIAamp DNA Blood (QIAGEN, Hilden, Germany):

Se pipetearon 20 µL de proteasa en un tubo de 1.5 mL, al cual se añadieron 200 µL de la muestra y 200 µL del tampón AL. Se agitó con vortex durante 15

segundos y se incubó a 56 °C durante 10 minutos. Tras un breve pulso en la microcentrífuga, se añadieron 200 µL de etanol al 96-100%. Se agitó con vortex durante 15 segundos y se dio un pulso en la microcentrífuga. Se transfirió el contenido a una columna de extracción acoplada a un tubo de 2 mL (ambos suministrados en el kit) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se cambió la columna a un tubo de 2 ml limpio y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL del tampón AW1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se cambió la columna con filtro a un tubo de 2 mL limpio y se descartó el filtrado. Se añadieron 500 µL del tampón AW2, se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos, se volvió a cambiar la columna a un tubo limpio de 2 mL y se eliminó el volumen sobrante del tubo anterior. La columna de extracción se depositó en un tubo estéril de 1.5 mL y se eluyó con 100 µL del tampón AE. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. El extracto de ADN (sobrenadante) se guardó a - 20 °C hasta su uso.

- Protocolo para la extracción de ADN de biopsias y garrapatas mediante el kit comercial QIAamp DNA Tissue (QIAGEN, Hilden, Germany):

Una vez que el tejido estuvo totalmente triturado con bisturí estéril se añadieron 180 µL del tampón ATL y 20 µL de proteinasa K (50 mg/mL). Se mezclaron con un vortex durante 15 segundos, se dio un pulso en la microcentrífuga y se incubaron a 56 °C toda la noche. Se añadieron 200 µl del tampón ATL, se dio un vortex durante 15 segundos y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm y se traspasó el contenido del tubo a un tubo limpio de 1.5 mL, eliminando así los restos de tejido. Se añadieron 200 µl de etanol al 96-100%. Se agitó con vortex 15 segundos y se dio un pulso en la microcentrífuga. Se transfirió todo el contenido a una columna de extracción acoplada a un tubo de 2 mL (ambos suministrados en el kit). Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se cambió la columna a un tubo de 2 mL limpio y se eliminó el filtrado del tubo anterior. Se añadieron 500 µL del tampón AW1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se traspasó la columna a un tubo de 2 mL limpio y se descartó el filtrado. Se añadieron 500 µL del tampón AW2, se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos y se volvió a cambiar la columna

a un tubo limpio de 2 mL, eliminándose el filtrado del tubo anterior. Se depositó la columna de extracción en un tubo estéril de 1.5 mL y se añadieron 100 µL del tampón AE. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. El extracto de ADN (sobrenadante) se guardó a - 20 °C hasta su uso.

Tanto para la extracción de ADN de las muestras de sangre (completa con EDTA, plasma, capa leucocitaria, eritrocitos) y suero, como para las de biopsias y garrapatas se introdujeron controles negativos de extracción (agua destilada) que se procesaron junto con el resto de las muestras.

2.5. Cuantificación de ADN

Para determinar la concentración de ADN de una muestra, se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 y 280nm. A 260nm, una densidad óptica (D.O.) de una unidad arbitraria de absorbancia (u.a.a.) corresponde, aproximadamente, a 50µg/mL de ADN de doble hebra y a 20µg/mL, si el ADN es monocatenario. El valor del cociente de la lectura de absorbancias medidas a 260 y 280 nm permite estimar la pureza de los ácidos nucleicos. Si este cociente oscila entre 1,8 y 2, el ADN de la muestra es puro y puede emplearse para su secuenciación (Sambrook *et al.*, 1989).

2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En nuestro centro, de acuerdo a nuestra experiencia y a la bibliografía existente, constantemente estamos actualizando diferentes métodos de PCR para mejora el diagnóstico molecular de los pacientes con rickettsiosis. Así, en el laboratorio disponemos de diferentes ensayos de PCR; por ello, dado que las muestras que se han procesado para llevar a cabo este trabajo han llegado a nuestro laboratorio durante un periodo de 5 años, éstas fueron procesadas en primer término con el método de PCR que se utilizaba en el laboratorio en ese momento, y posteriormente, cuando se diseñó este trabajo cada muestra que cumplía los requisitos expuestos en el apartado 1 (Muestras estudiadas), se procesó con todos los métodos de PCR que se evalúan en esta memoria, y se detallan en este mismo apartado.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en las más estrictas condiciones de esterilidad, de tal forma que la mezcla de la reacción se preparó en el interior de una cabina de PCR, y la adición del ADN se llevó a cabo en otra sala distinta. Del mismo modo, en el caso de que se tratase de reacciones de PCR anidadas o semianidadas, la segunda reacción, en la que ya se trabajaba con producto amplificado, se realizó en un laboratorio distinto.

En todas las reacciones de PCR se introdujeron controles positivos (*R. conorii* o *R. slovaca* cultivadas en células Vero, cedidas por la Dra. Fátima Bacellar, Centro de Estudos de vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde, Aguas de Moura, Portugal) y controles negativos (un tubo con todos los componentes de la reacción de PCR excepto los cebadores, y otro tubo con todos los componentes pero esta vez sin ADN) que se procesaron junto con el resto de los tubos, en cada reacción de PCR.

La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 μL , utilizando los componentes y las concentraciones indicadas en la tabla 14.

Tabla 14. Componentes de una reacción de PCR, concentración y volumen de cada uno de ellos.

Componentes	Concentración del stock	Volumen por reacción (V _{final} =50 µl)	Concentración final de reacción
Cebador directo	50 pmol/µL	1 µL	50 pmol
Cebador inverso (TIB MOLBIOL, Berlin)	50 pmol/µL	1 µL	50 pmol
BIOTAQ™ ADN polimerasa (Bioline)	5 U/µL	0,3µL	1,5 U
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	(10x)	5µL	(1x)
MgCl ₂ (Bioline)	50mM	3µL	3mM
4 dNTP mix (Bioline)	10mM	1µL	0,2mM
ADN molde	---	1.5 µL -38.7 µL	150 ng
Agua miliQ estéril (Sigma)	---	Hasta completar 50µL	---

A continuación se detallan los distintos métodos de PCR que se evaluaron en este trabajo:

[Gen ARNr 16S](#), del que se amplificó una región de 426 pb con los cebadores fD1 y Rc16S.452n. (Weisburg *et al.*, 1991, Márquez *et al.*, 1998). Las secuencias de los cebadores y las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen ARNr 16S para la detección de *Rickettsia* spp.

Secuencia de los cebadores (5' →3')	Condiciones
fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG Rc16S.452n: AACGTCATTATCTTCCTTGC	95°C 2 min 1 ciclo
	95°C 20 seg
	59°C 30 seg
	72°C 45 seg
	72°C 5 min 1 ciclo

[Gen ompA](#), que codifica un antígeno de superficie de 190-kDa. En este caso se realizó una PCR semianidada (Oteo *et al.*, 2004b). En la primera reacción de PCR se emplearon los cebadores Rr190.70p y Rr190.701n (Regnery *et al.*, 1991; Roux *et al.*, 1996), amplificando un fragmento de 631 pb. Para la segunda reacción, que amplifica un fragmento interior de 532 pb, se emplearon los cebadores Rr190.70p y Rr190.602n (Regnery *et al.*, 1991). En la siguiente tabla aparecen las secuencias de los cebadores y las condiciones de las reacciones de PCR.

Tabla 16. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen *ompA*.

Secuencia de los cebadores (5' →3')	Condiciones
Rr190.70p: ATGGCGAATATTTCTCCAAAA Rr190.701n: GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	95°C 3 min 1 ciclo 95°C 20 seg 46°C 30 seg 35 ciclos 63°C 1 min 72°C 7 min 1 ciclo
Rr190.70p: ATGGCGAATATTTCTCCAAAA Rr190.602n: AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	96°C 30 seg 1 ciclo 94°C 30 seg 50°C 30 seg 35 ciclos 72°C 45 seg 72°C 7 min 1 ciclo

[Gen *gltA*](#), que codifica la enzima citrato sintasa, del que se amplificaron dos regiones distintas:

-Una región de 337 pb, amplificada mediante una PCR anidada con los cebadores RpCS.877p y RpCS.1258n (1ª reacción, 381pb) (Regnery *et al.*, 1991) y RpCS.896p y RpCS.1,233n (Choi *et al.*, 2005a).

-Una región de 401 pb, empleando los cebadores CS-78 y CS-323 (Labruna *et al.*, 2004).

La secuencia de los cebadores y las condiciones de las reacciones de PCR se muestran en la tabla 16.

Tabla 17. Secuencia nucleotídica de los cebadores y condiciones de amplificación del gen *gltA*.

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones
RpCS.877p: GGGGGCCTGCTCACGGCGG RpCS.1258n: ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	95°C 1 min 1 ciclo 95°C 20 seg 49°C 30 seg 35 ciclos 60°C 2 min 60°C 7 min 1 ciclo
RpCS.896p: GGCTAATGAAGCAGTGATAA RpCS.1,233n: GCGACGGTATACCCATAGC	95°C 5 min 1 ciclo 95°C 15 seg 54°C 15 seg 35 ciclos 72°C 30 seg 72°C 3 min 1 ciclo
CS-78: GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT CS-323: GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	95°C 3 min 1 ciclo 95°C 15 seg 48°C 30 seg 40 ciclos 72°C 30 seg 72°C 7 min 1 ciclo

[Gen *ompB*](#), que codifica un antígeno de superficie de 120-kDa. Se llevó a cabo una PCR anidada. Para la 1ª reacción se utilizaron los cebadores *rompB*-OF y *rompB*-OR, que amplifican un fragmento de 511 pb. La 2ª reacción se llevó a cabo con los cebadores *rompB* SFG-IF y *rompB* SFG-IR, que delimitan un fragmento de 420 pb dentro del anterior (Choi *et al.*, 2005a). La secuencia de los cebadores y las condiciones de las reacciones de PCR se detallan en la tabla 18.

Tabla 18. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen *ompB*.

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones
rompB-OF: GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA rompB-OR: GCTTTATAACCAGCTAAACCACC	95°C 5 min 1 ciclo
	95°C 15 seg
	54°C 15 seg 35 ciclos
	72°C 30 seg
	72°C 3 min 1 ciclo
rompB SFG-IF: GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA rompB SFG/TG-IR: GGTTTGGCCCATATACCATAAG	95°C 5 min 1 ciclo
	95°C 15 seg
	56°C 15 seg 35 ciclos
	72°C 30 seg
	72°C 3 min 1 ciclo

Gen *htrA*, que codifica una proteína de membrana de 17kDa. En este gen se amplificó una región de 434 pb empleando los cebadores 17kDa-1 y 17kDa-2 (Webb *et al.*, 1990; Oliveira *et al.*, 2002). La secuencia de los cebadores y las condiciones que se emplearon en la reacción de PCR se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Secuencia de los cebadores y condiciones de la reacción de PCR para el gen *htrA*.

Secuencia de los cebadores (5' →3')	Condiciones
17kDa-1: GCTCTTGCAACTTCTATGTT 17kDa-2: CATTGTTCGTCAGGTTGGCA	3 min 94°C 1 ciclo
	1 min 94°C
	5 min 48°C
	2 min 72°C
	5 min 72°C 1 ciclo
	30 ciclos

2.7. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa. Los geles se prepararon con agarosa (Pronadisa) a una concentración en el rango 0,8-1,2% en tampón TBE [54g/l Tris (hidroximetil) aminometano; 27,5g/L ácido bórico; 20ml EDTA 0,5M, pH8] y bromuro de etidio (Bio-Rad), a una concentración final de 0,5 µg/ml. Cada muestra se preparó mezclando 5µl de ADN con 2 µl de tampón de carga [sacarosa 40% (p/V); azul de bromofenol 0,25% (p/V); xilene cianol 0,25% (p/V)]. Se utilizó el marcador de peso molecular Hyperladder IV (Bioline). Una vez cargadas las muestras en el gel, éste se sumergió completamente en tampón TBE en la cubeta de electroforesis. El ADN migró a 80-100 voltios desde el polo negativo al positivo durante el tiempo necesario para la separación adecuada de los fragmentos de interés. Cuando el frente de la carrera alcanzó el 75-100% de la longitud del gel, éste se visualizó en un transiluminador a 340 nm, y se fotografió con un sistema captador de imágenes (Gel Doc, de BIO-RAD) mediante el software *Quantity One*.

2.8. Secuenciación y análisis de resultados positivos

Las muestras positivas se purificaron y secuenciaron en la Universidad de Alcalá de Henares y las secuencias obtenidas se estudiaron con el programa Bioedit y se compararon con las de la base de datos GenBank usando el programa BLAST (Nacional Centre for Biotechnology Information) Los alineamientos de las distintas secuencias se realizaron mediante el programa Clustalw2 (EBI services).

2.9. Incorporación de secuencias a la base de datos GenBank

En los casos en que por su carácter novedoso se consideró oportuno, las secuencias nucleotídicas y su traducción a proteínas se incorporaron a GenBank empleando el programa Sequin (versión 6.15).

RESULTADOS

1. DETECCIÓN DE *Rickettsia* spp. EN LAS MUESTRAS

Se detectó *Rickettsia* spp. en un total de 72 muestras pertenecientes a 52 pacientes con rickettsiosis. Las muestras en las que se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. con alguno de los métodos de PCR estudiados fueron: sangre completa con EDTA (n=16), plasma (n=2), capa leucocitaria (n=4), capa eritrocitaria (n=12), suero (n=8), biopsias (n=3) y garrapatas retiradas sobre pacientes que habían desarrollado rickettsiosis (n=27). Las garrapatas fueron identificadas como *D. marginatus* (n=24) y *R. sanguineus* (n=3).

En 8 de los 52 pacientes la única muestra en la que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. fue la de sangre completa con EDTA. En 2 pacientes, además de en la muestra de sangre completa con EDTA, se detectó *Rickettsia* spp. en la capa leucocitaria. En un paciente se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en la muestra de sangre completa con EDTA, en la capa leucocitaria y en la capa eritrocitaria. En dos pacientes las muestras positivas fueron las de sangre completa con EDTA, capa eritrocitaria y la muestra de suero. En un paciente se consiguió amplificar *Rickettsia* spp. en sangre completa con EDTA, plasma, capa eritrocitaria y suero. En un paciente se detectó *Rickettsia* spp. en el plasma, la capa eritrocitaria y en el suero. Un paciente tuvo positivas la capa leucocitaria y la capa eritrocitaria, y otro, la sangre completa con EDTA y el suero. En dos pacientes se detectó *Rickettsia* spp. únicamente en el suero, en tres pacientes, en la capa eritrocitaria y en otros tres en la biopsia. En cuatro de los pacientes se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en el artrópodo, además de en alguna de las otras muestras clínicas, concretamente en tres de los pacientes se detectó en la capa eritrocitaria y en otro en las muestras de sangre completa con EDTA y suero. En veintitrés pacientes sólo se pudo detectar *Rickettsia* spp. en la garrapata.

En la siguiente tabla se pueden ver las diferentes muestras en las que se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp.

Tabla 20. Detección de *Rickettsia* spp. en muestras de pacientes.

N° Pacientes	Tipo de Muestra						
	Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
20	-	-	-	-	-	ND	+
7	+	-	-	-	-	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
3	-	-	-	+	-	ND	ND
2	+	-	+	-	-	ND	ND
2	-	-	-	+	-	ND	+
2	+	-	-	+	+	ND	ND
2	-	-	-	-	-	+	ND
1	-	-	-	+	-	ND	+
1	+	ND	ND	ND	-	ND	ND

N° Pacientes	Tipo de Muestra						
	Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
1	-	ND	ND	ND	+	ND	ND
1	+	-	-	-	+	ND	+
1	-	-	-	-	+	ND	ND
1	+	-	-	-	+	ND	ND
1	-	+	-	+	+	ND	ND
1	+	+	-	+	+	ND	ND
1	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
1	-	-	+	+	-	ND	ND
1	+	-	+	+	-	ND	ND

Cp.: Capa, +: positivo, -: negativo, ND: no disponible

Además de en las 72 muestras anteriores, se detectó *Rickettsia* spp. en 18 garrapatas retiradas de personas que no desarrollaron enfermedad. Estas garrapatas fueron clasificadas como: *D. marginatus* (n=4), *H. marginatum* (n=8), *R. sanguineus* (n=3) y *R. bursa* (n=3).

2. SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS DE PCR EMPLEADOS

2.1. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. en las muestras clínicas de pacientes sintomáticos

***PCRs sencillas**

Para llevar a cabo la detección de *Rickettsia* spp. en las 72 muestras clínicas de pacientes con rickettsiosis se realizaron 6 reacciones de PCR simples utilizando como dianas fragmentos de los siguientes genes:

- ***gltA* (región central)**

Se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en 8 muestras (11,1%): *D. marginatus* (n=5) y *R. sanguineus* (n=3).

- ***htrA***

Se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en 10 de las muestras (13,8%): *D. marginatus* (n=7) y *R. sanguineus* (n=3).

- ***ompA***

Se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en 10 muestras (13,8%): biopsia (n=1), *D. marginatus* (n=6) y *R. sanguineus* (n=3).

- **ARNr 16S**

Se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en 13 muestras (18%): *D. marginatus* (n=10) y *R. sanguineus* (n=3).

- ***ompB***

Se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en 17 muestras (23,6%): *D. marginatus* (n=15) y *R. sanguineus* (n=2).

- ***gltA* (extremo 5')**

Se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en 24 muestras (33,3%): biopsia (n=1), *D. marginatus* (n=20) y *R. sanguineus* (n=3).

*PCRs secuenciales

En las 72 muestras también se llevaron a cabo 3 reacciones de PCR secuenciales (anidadas o semianidadas) de los genes:

- ***ompA***

Mediante una PCR semianidada del gen *ompA* se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en 35 muestras clínicas (48,6%): sangre completa con EDTA (n=4), capa leucocitaria (n=1), capa eritrocitaria (n=2), biopsia (n=2), suero (n=1) y 25 artrópodos, *D. marginatus* (n=22) y *R. sanguineus* (n=3).

- ***gltA* (región central)**

Mediante una PCR anidada se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en 42 de las muestras clínicas analizadas (58,3%): sangre completa con EDTA (n=9), plasma (n=2), capa eritrocitaria (n=5), biopsia (n=3), suero (n=4) y 19 artrópodos, *D. marginatus* (n=16) y *R. sanguineus* (n=3).

- ***ompB***

Mediante una PCR anidada se logró amplificar ADN de *Rickettsia* spp. en 60 muestras clínicas (83,3%): sangre completa con EDTA (n=12), plasma (n=2), capa leucocitaria (n=4), capa eritrocitaria (n=10), biopsia (n=3), suero (n=5) y 24 artrópodos: *D. marginatus* (n=21) y *R. sanguineus* (n=3).

Tabla 21. Número y porcentaje (en orden creciente) de muestras clínicas de pacientes sintomáticos en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. empleando diferentes métodos de PCR.

Tipo de PCR	Gen (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
PCR sencilla	<i>gltA</i> (región central)	8 (11,1)
	<i>htrA</i>	10 (13,8)
	<i>ompA</i>	10 (13,8)
	ARNr 16S	13 (18)
	<i>ompB</i>	17 (23,6)
	<i>gltA</i> (extremo 5')	24 (33,3)
PCR secuencial	<i>ompA</i> *	35 (48,6)
	<i>gltA</i> **	42 (58,3)
	<i>ompB</i> **	60 (83,3)

*PCR semianidada, ** PCR anidada

Nota: Tanto en el texto como en las tablas que se presentan en este trabajo, en el caso de los métodos de PCR de los genes *ompA*, *ompB* y *gltA*, en los casos en que no se añade información adicional, nos referiremos a PCRs sencillas (1ª reacción de PCR).

2.1.1. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. empleando dos métodos de PCR

2.1.1.A. Métodos de PCR simples

Al realizar dos ensayos de PCR simples, la máxima rentabilidad (25/72 muestras; 34,7%) se obtuvo al utilizar como dianas fragmentos de los genes *gltA* (extremo 5') y *ompA*.

Tabla 22. Número y porcentaje (en orden creciente) de muestras clínicas en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. combinando dos reacciones de PCR simples.

Genes (región)	N° de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i>	11 (15,27)
<i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c)	13 (18)
ARNr 16S + <i>htrA</i>	
<i>ompA</i> + <i>htrA</i>	
ARNr 16S + <i>ompA</i>	15 (20,8)
<i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i>	18 (25)
<i>ompA</i> + <i>ompB</i>	19 (26,38)
ARNr 16S + <i>ompB</i>	20 (27,7)
<i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
<i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5')	24 (33,3)
<i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	
<i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5')	
<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i>	25 (34,7)

(c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.1.B. Reacciones de PCR secuenciales

Como se indica en el punto 2.1, mediante las reacciones de PCR secuenciales de los genes *ompA*, *gltA*, y *ompB* se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. en 35 (48,6%), 42 (58,3%), y 60 (83,3%) de las muestras clínicas procesadas, respectivamente.

2.1.2. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. empleando tres métodos de PCR

2.1.2.A. Combinación de tres métodos de PCR simples

Si combinamos tres de las reacciones de PCR simples, los porcentajes de detección de *Rickettsia* spp. en las muestras oscilaron entre el 18 (13 muestras) y el 34,7% (25 muestras). Este último porcentaje es el mismo que se obtuvo al combinar las PCRs simples de *gltA* (extremo 5') y *ompA* (véase punto 2.1.1.A).

Tabla 23. Número y porcentaje de muestras (en orden creciente) en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar tres reacciones de PCR simples.

Genes (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	13 (18)
<i>htrA</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (c)	14 (19,4)
ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	15 (20,8)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i>	
<i>ompA</i> + <i>ompB</i> + <i>gltA</i> (c)	19 (26,3)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i>	20 (27,7)
ARNr 16S + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>gltA</i> (c)	
ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	21 (29,1)
<i>ompA</i> + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5')	24 (33,3)
<i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
<i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	
<i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	

Genes (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	25 (34,7)
<i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i>	
<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i>	

(c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.2.B. Combinación de un método de PCR secuencial con un método de PCR simple

Si combinamos las reacciones de PCR secuenciales con cada una de las reacciones de PCR simples obtuvimos la máxima rentabilidad con la PCR anidada del gen *ompB* y la PCR simple del gen *ompA*, detectándose ADN de *Rickettsia* spp. en 61 de 72 muestras (84,7%).

2.1.2.B-1 Reacción de PCR semianidada del gen *ompA* combinada con una reacción de PCR simple

Con la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en 35 de las 72 muestras (48,6%) (véase tabla 21). Añadiendo las reacciones de PCR de los genes ARNr 16S, *gltA* (región central) o *htrA* no se consiguió aumentar el número de muestras positivas. Al combinarlo con las reacciones de *gltA* (extremo 5') u *ompB* se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en una muestra más (36 muestras, 50%).

Tabla 24. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. combinando la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* con cada una de las reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompA</i> * +	ARNr 16S	35 (48,6)
	<i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (5')	36 (50)
	<i>ompB</i>	

*: PCR semianidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.2.B-2 Método de PCR anidada del gen *gltA* combinado con una reacción de PCR simple

Con la PCR anidada del gen *gltA* se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. en 42 de las 72 muestras procesadas (58,3%) (véase tabla 21). Al combinar esta PCR secuencial con las diferentes PCR simples, se aumentó la sensibilidad en todos los casos, salvo al utilizar como diana un fragmento del gen *htrA*.

Tabla 25. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. combinando la reacción de PCR anidada del gen *gltA* con cada una de las reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>gltA</i> ** +	<i>htrA</i>	42 (58,3)
	ARNr 16S	43 (59,7)
	<i>ompA</i>	44 (61,1)
	<i>gltA</i> (5')	48 (66,6)
	<i>ompB</i>	

** : PCR anidada, (5'): extremo 5'

2.1.2.B-3 Reacción de PCR anidada del gen *ompB* combinada con una reacción de PCR simple

La reacción de PCR anidada del gen *ompB* permitió amplificar *Rickettsia* spp. en 60 de las 72 muestras (83,3%) (véase tabla 21). Sólo se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en una muestra más cuando añadimos la reacción de PCR que utiliza como diana el fragmento del gen *ompA*.

Tabla 26. Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. mediante la combinación de la reacción de PCR anidada del gen *ompB* con las reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompB</i> ** +	ARNr 16S	60 (83,3)
	<i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (5')	
	<i>htrA</i>	
	<i>ompA</i>	61 (84,7)

** : PCR anidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.3. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. empleando cuatro métodos de PCR

2.1.3.A. Combinación de cuatro reacciones de PCR simples

Al realizar 4 reacciones de PCR simples en las diferentes muestras procesadas se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en 25 de las 72 muestras (34,7%), (véase tabla 22), el mismo número de muestras en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar 2 reacciones de PCR con los genes *gltA* (extremo 5') y *ompA*, o al realizar 3 reacciones de PCR simples con estos dos mismos genes combinados con el resto de las reacciones de PCR simples [genes ARNr 16S, *htrA*, *gltA* (región central) y *ompB*], véase tabla 23.

Tabla 27. Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar cuatro reacciones de PCR simples.

Genes (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	15 (20,8)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	20 (27,7)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	21 (29,16)
ARNr16S + <i>ompA</i> + <i>htrA</i> + <i>ompB</i>	
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (c)	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	24 (33,3)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i> + <i>gltA</i> (5')	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5')	25 (34,7)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5')	
<i>htrA</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	
<i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	

(c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.3.B. Combinación de un método de PCR secuencial con dos métodos de PCR simples

Al combinar una de las reacciones de PCR secuencial con dos de las reacciones de PCR simples se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en un máximo de 61 muestras (84,7%), las mismas en las que se detectó ADN rickettsial con tres reacciones de PCR (una PCR anidada del gen *ompB* y una PCR simple del gen *ompA*). El hecho de añadir una segunda reacción de PCR simple no permitió aumentar el nº de muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp.

2.1.3.B-1 Reacción de PCR semianidada del gen *ompA* combinada con dos métodos de PCR simples

Al realizar la PCR semianidada de *ompA* combinada con dos reacciones de PCR simples, no se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en ninguna muestra más.

Tabla 28. Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR semianidada del gen *ompA* y dos reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompA</i> * +	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5')	35 (48,6)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (c)	
	ARNr 16S + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (c)+ <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>ompB</i>	36 (50)
	<i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (c)+ <i>ompB</i>	
	<i>ompB</i> + <i>htrA</i>	

*: PCR semianidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.3.B-2 Reacción de PCR anidada del gen *gltA* combinada con dos métodos de PCR simples

Al realizar la PCR anidada de *gltA* y dos PCRs simples, se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en un máximo de 49 muestras, 7 muestras más que si realizáramos sólo la reacción de PCR anidada, y una muestra más que si asociáramos a ésta las reacciones de PCR simples de *ompB* y *gltA* (extremo 5').

Tabla 29. Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *gltA* y dos reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>gltA</i> ** +	ARNr 16S + <i>htrA</i>	43 (59,7)
	<i>htrA</i> + <i>ompA</i>	44 (61,1)
	ARNr 16S + <i>ompA</i>	45 (62,5)
	<i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	48 (66,6)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5')	
	<i>htrA</i> + <i>ompB</i>	
	ARNr 16S + <i>ompB</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	
	<i>ompA</i> + <i>ompB</i>	49 (68)
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i>	

** : PCR anidada, (5') : extremo 5'

2.1.3.B-3 Reacción de PCR anidada del gen *ompB* combinada con dos métodos de PCR simples

Al realizar la PCR anidada de *ompB* y dos PCRs simples, no se consiguió aumentar el nº de muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp.

Tabla 30. Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *ompB* y dos reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompB</i> ** +	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5')	60 (83,3)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (c)	
	ARNr 16S + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i>	61 (84,7)
	<i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i>	
	ARNr 16S + <i>ompA</i>	
	<i>ompA</i> + <i>htrA</i>	

** : PCR anidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.3.C. Combinación de dos reacciones de PCR secuenciales

La máxima rentabilidad (68 de 72 muestras; 94,4%) para la detección de ADN de *Rickettsia* spp. con 4 reacciones de PCR se consiguió llevando a cabo dos reacciones de PCR anidadas (*ompB* y *gltA*). La PCR semianidada de *ompA* combinada con las PCRs anidadas de *ompB* o de *gltA*, permitió la detección de ADN de *Rickettsia* spp. en 66 (91,6%) y 54 muestras (75%), respectivamente.

2.1.4. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. empleando cinco métodos de PCR

2.1.4.A. Combinación de cinco reacciones de PCR simples

Al igual que al realizar dos, tres o cuatro reacciones de PCR simples, el porcentaje más alto de detección de *Rickettsia* spp. en muestras clínicas con la combinación de 5 reacciones de PCR simples fue de 34,7%.

Tabla 31. Número de muestras (en orden creciente) en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar cinco reacciones de PCR simples.

Genes (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (c) + ARNr 16S	21 (29,1)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	24 (33,3)
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	25 (34,7)
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	
<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5') + ARNr 16S	
ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	

(c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.4.B. Combinación de un método de PCR secuencial con tres métodos de PCR simples

Al combinar una reacción de PCR secuencial con 3 de las reacciones de PCR simples se consiguió detectar *Rickettsia* spp. como máximo en 61 de las 72 muestras (84,7%).

2.1.4.B-1 Reacción de PCR semianidada del gen *ompA* combinada con tres métodos de PCR simples

El número y el porcentaje de muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. asociando tres reacciones de PCR simples con la reacción de PCR

semianidada del gen *ompA*, fue el mismo que ya se obtuvo asociando una o dos reacciones de PCR simples.

Tabla 32. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR semianidada del gen *ompA* y tres reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompA</i> * +	ARNr 16S + <i>htrA</i> + <i>gltA</i> (c)	35 (48,6)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	36 (50)
	ARNr 16S + <i>ompB</i> + <i>gltA</i> (5')	
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>htrA</i> + <i>ompB</i>	
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
	<i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	

*: PCR semianidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.4.B-2 Reacción de PCR anidada del gen *gltA* combinada con las reacciones de PCR simples

Al realizar la PCR anidada de *gltA* y tres PCRs simples, se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en 49 de las 72 muestras clínicas (68%).

Tabla 33. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *gltA* y tres de las reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>gltA</i> ** +	ARNr 16S + <i>htrA</i> + <i>ompA</i>	45 (62,5)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	48 (66,6)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>htrA</i> + <i>ompB</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	49 (68)
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	
	<i>ompA</i> + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i>	

** : PCR anidada, (5') : extremo 5'

2.1.4.B-3 Reacción de PCR anidada del gen *ompB* combinada con tres reacciones de PCR simples

La combinación de tres reacciones de PCR simples con la reacción de PCR anidada del gen *ompB* permitió detectar *Rickettsia* spp. en 61 muestras, el mismo número de muestras resultante de la asociación de una o dos reacciones de PCR simples.

Tabla 34. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *ompB* y tres reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompB</i> ** +	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c)	60 (83,3)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>htrA</i> + <i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5')	61 (84,7)
	ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	
	ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (c)	
	<i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>htrA</i>	
	<i>ompA</i> + <i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	

** : PCR anidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.4.C. Combinación de dos métodos de PCR secuenciales con las reacciones de PCR simples

Al añadir una de las reacciones de PCR simples de los genes ARNr 16S, *gltA* (extremo 5'), *ompB* o *htrA* a la combinación de las reacciones de PCR secuenciales de los genes *gltA* y *ompA* no se modificó el porcentaje de muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. (54 de 72 muestras, 75%). Lo mismo ocurrió al añadir estas reacciones de PCR simples a la combinación de las reacciones de PCR secuenciales de los genes *ompA* y *ompB*. El número de muestras en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. fue 66 (91,6%), el mismo que se obtenía sólo con las dos reacciones de PCR secuenciales.

Al realizar las PCRs secuenciales de los genes *gltA* y *ompB*, y una de las PCRs simples antes citadas, no se consiguió aumentar el nº de muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp., en ningún caso, salvo al utilizar la PCR simple de *ompA*. Con esta combinación se obtuvieron 69 muestras positivas (95,8%).

2.1.5. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. empleando seis métodos de PCR

2.1.5.A. Combinación de seis reacciones de PCR simples

Al realizar las 6 reacciones de PCR [genes ARNr 16S, *gltA* (extremo 5' y región central), *ompA*, *ompB* y *htrA*] se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en 25 muestras (34,7%).

2.1.5.B. Combinación de un método de PCR secuencial con cuatro métodos de PCR simples

Al asociar una cuarta reacción de PCR simple a las reacciones de PCR secuenciales, no se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en ninguna muestra más.

2.1.5.B-1. Reacción de PCR semianidada del gen *ompA* combinada con cuatro métodos de PCR simples

Al asociar una cuarta reacción de PCR simple a la reacción de PCR semianidada del gen *ompA*, se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en 36 muestras (50%).

Tabla 35. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR semianidada del gen *ompA* y cuatro reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompA</i> * +	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i> + <i>gltA</i> (c)	36 (50)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i> + <i>gltA</i> (c)	
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i> + <i>ompB</i>	
	<i>htrA</i> + <i>gltA</i> (c) + <i>gltA</i> (5') + <i>ompB</i>	
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (c) + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	

*: PCR semianidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.5.B-2. Reacción de PCR anidada del gen *gltA* combinada con cuatro métodos de PCR simples

En la siguiente tabla se pueden ver las combinaciones de 4 reacciones de PCR simples con la reacción anidada del gen *gltA* y el número y porcentaje de muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp.

Tabla 36: Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *gltA* y cuatro reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>gltA</i> ** +	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i> + <i>ompB</i>	48 (66,6)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>ompA</i> + <i>ompB</i>	49 (68)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i> + <i>ompA</i>	
	<i>htrA</i> + <i>ompB</i> + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5')	
	ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>ompB</i> + <i>htrA</i>	

** : PCR anidada, (5') : extremo 5'

2.1.5.B-3. Reacción de PCR anidada del gen *ompB* combinada con cuatro métodos de PCR simples

En la siguiente tabla aparece el número y porcentaje de muestras en las que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una reacción de PCR anidada del gen *ompB* y cuatro reacciones de PCR simples.

Tabla 37. Número de muestras (en orden creciente) en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. al realizar una PCR anidada del gen *ompB* y cuatro reacciones de PCR simples.

PCR secuencial	PCR simple	N° de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
<i>ompB</i> ** +	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c) + <i>htrA</i>	60 (83,3)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i>	61 (84,7)
	ARNr 16S + <i>gltA</i> (5') + <i>htrA</i> + <i>ompA</i>	
	<i>htrA</i> + <i>gltA</i> (c) + <i>ompA</i> + <i>gltA</i> (5')	
	ARNr 16S + <i>ompA</i> + <i>htrA</i> + <i>gltA</i> (c)	

**.: PCR anidada, (c): región central, (5'): extremo 5'

2.1.5.C. Combinación de las tres reacciones de PCR secuenciales

Al realizar las tres reacciones de PCR secuenciales en las 72 muestras clínicas, se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. en todas las muestras.

2.1.6 Detección de ADN de *Rickettsia* spp. en las diferentes muestras procesadas

2.1.6.A. Fluidos y biopsias:

De las reacciones de PCR simples, sólo las que utilizan como dianas fragmentos de los genes ARNr 16S, *gltA* (extremo 5') y *ompA* permitieron detectar *Rickettsia* spp. en los fluidos y biopsias de los pacientes. Utilizando el resto de las reacciones de PCR simples [*gltA* (región central), *ompB* o *htrA*] no se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en ninguna de estas muestras. En cuanto a las reacciones de PCR secuenciales, la que utiliza como diana el gen *ompB*, fue la única con la que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en todos los tipos de fluidos (sangre completa con EDTA, suero, plasma, capa leucocitaria y capa eritrocitaria) y en las biopsias. La reacción de PCR anidada del gen *gltA* no amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en

ninguna de las muestras de la capa leucocitaria, y mediante la PCR semianidada del gen *ompA* no se detectó *Rickettsia* spp. en ninguna de las muestras de plasma.

A continuación se detallan los diferentes tipos de fluidos y biopsias y, los genes con los que se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp.

- **Capa leucocitaria:** Mediante la reacción de PCR anidada del gen *ompB* se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. en las 4 muestras de capa leucocitaria incluidas en este estudio. En una de ellas también se consiguió detectar *Rickettsia* spp. con la reacción de PCR simple del gen ARNr 16S, y en otra, con la reacción de PCR semianidada del gen *ompA*. No se detectó *Rickettsia* spp. en las muestras de la capa leucocitaria mediante las reacciones de PCR simples de los genes *gltA* (región central y extremo5'), *ompA*, *ompB* y *htrA*, ni con la reacción de PCR anidada del gen *gltA*.
- **Biopsias:** En las tres biopsias se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. mediante las reacciones de PCR anidadas de los genes *ompB* y *gltA*. Además, en dos de ellas se detectó ADN de *Rickettsia* spp. con la reacción de PCR semianidada del gen *ompA*, una de las cuales también fue positiva con la reacción de PCR simple del gen *gltA* (extremo 5'). Por el contrario, no se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. en las biopsias utilizando las reacciones de PCR simples de los genes ARNr 16S, *gltA* (región central), *ompA*, *ompB* y *htrA*.
- **Sangre completa tratada con EDTA:** Se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en 12 de las 16 muestras que se incluyeron en este trabajo mediante la PCR anidada del gen *ompB*; en 8, utilizando la PCR anidada del gen *gltA*, y en 4 con la PCR semianidada del gen *ompA*; una de ellas se consiguió amplificar con la reacción de PCR simple. La única de las reacciones de PCR simples que permitió detectar ADN de *Rickettsia* spp. a partir de la muestra de sangre completa tratada con EDTA fue la que utiliza como diana el gen *ompA*. Con el resto de las reacciones de PCR simples no se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. en ninguna de estas muestras.

- **Capa eritrocitaria:** Se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en las 12 muestras de capa eritrocitaria utilizando las reacciones de PCR secuenciales, en 10 de ellas utilizando como diana *ompB*; en 6 *gltA*, y en 2 *ompA*. En 2 de las 6 muestras en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. con la PCR anidada del gen *gltA*, no se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. con la PCR anidada del gen *ompB*. En cambio, en las dos muestras en las que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. con la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* se detectó esta especie de rickettsia con las reacciones de PCR anidadas de *ompB* y *gltA*.
- **Plasma:** En las dos muestras de plasma se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. mediante las reacciones de PCR anidadas de los genes *gltA* y *ompB*. No se consiguió detectar *Rickettsia* spp. utilizando la reacción de PCR semianidada del gen *ompA*, ni con ninguna de las reacciones de PCR simples.
- **Suero:** En 5 de las 8 muestras de suero se detectó *Rickettsia* spp. empleando la reacción de PCR anidada del gen *ompB*. En 4 se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. mediante la reacción de PCR anidada del gen *gltA*. Utilizando la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en una de las muestras de suero, en la que no se consiguió detectar *Rickettsia* spp. con las otras dos reacciones de PCR secuenciales. Mediante las reacciones de PCR simples no se amplificó *Rickettsia* spp. en ninguna de las muestras de suero.

En las biopsias y en las muestras de plasma, tanto la reacción de PCR anidada del gen *gltA*, como la del gen *ompB* permitieron detectar *Rickettsia* spp. en el 100% de estas muestras. En el caso de la capa leucocitaria, fue la reacción de PCR anidada del gen *ompB* la que consiguió amplificar *Rickettsia* spp. en todas las muestras. Para el resto de fluidos fue necesario combinar más de una de las reacciones de PCR secuenciales para conseguir amplificar *Rickettsia* spp. en el 100% de las muestras. En el caso de las muestras de sangre completa tratada con EDTA, tal y como se muestra en la tabla 38, la reacción de PCR anidada del gen *ompB* fue la que permitió detectar *Rickettsia* spp. en un mayor número de

muestras (75%). Cuando añadimos a esta reacción de PCR, la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* detectamos *Rickettsia* spp. en el 93% de las muestras. Para conseguir detectar *Rickettsia* spp. en todas las muestras de sangre completa tratada con EDTA hubo que asociar a estas dos reacciones de PCR, la reacción de PCR anidada del gen *gltA*. Si en lugar de asociar la reacción de PCR anidada del gen *ompB* con la reacción semianidada del gen *ompA*, añadimos la reacción de PCR anidada del gen *gltA*, detectamos *Rickettsia* spp. en el 87,5% de las muestras.

En el caso de la capa eritrocitaria, la reacción de PCR anidada del gen *ompB* permitió detectar *Rickettsia* spp. en el 83% de estas muestras. Cuando añadimos la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* no conseguimos aumentar el porcentaje de detección de *Rickettsia* spp. En cambio, cuando asociamos la reacción de PCR anidada del gen *gltA*, se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en el 100% de estas muestras. Para conseguir detectar *Rickettsia* spp. en todas las muestras de suero hubo que realizar las tres reacciones de PCR secuenciales. Cuando combinamos las reacciones de PCR anidadas de los genes *ompB* y *gltA*, obtuvimos el 87,5% de las muestras con *Rickettsia* spp., y al combinar las reacciones de PCR anidadas de los genes *ompB* y *ompA*, el 75%.

Tabla 38: Porcentajes de detección de ADN de *Rickettsia* spp. en fluidos y biopsias.

Genes Tipo de muestras (número)	PCR simple						PCR secuencial		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
Capa leucocitaria (4)	25%	0%	0%	0%	0%	0%	25%	0%	100%
Biopsia (3)	0%	0%	33,3%	0%	0%	0%	66,6%	100%	100%
Sangre con EDTA (16)	0%	0%	0%	6,25%	0%	0%	25%	50%	75%
Capa eritrocitaria (12)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	16,6%	50%	83,3%
Plasma (2)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%
Suero (8)	0%	0%	0%	0%	0%	0%	12,5%	50%	62,5%
Total (45)	0%	0%	2,2%	2,2%	0%	0%	22,2%	51,1%	80%

(5'): extremo 5', (c): región central, *: PCR semianidada, **: PCR anidada

2.1.6.B. Artrópodos

Para detectar *Rickettsia* spp. en los artrópodos de pacientes sintomáticos la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* fue la que mostró una mayor sensibilidad, ya que detectó *Rickettsia* spp. en el 92,6% de las garrapatas. La reacción de PCR anidada del gen *ompB* amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en el 88% de las muestras, y la del gen *gltA*, en el 70,3%. En cuanto a las reacciones de PCR simples, la reacción que utiliza como diana un fragmento del gen *gltA* (extremo 5') permitió detectar *Rickettsia* spp. en el 85,1% de los artrópodos. Las reacciones de PCR de los genes ARNr 16S, *gltA* (región central), *ompA*, *ompB* y *htrA* detectaron *Rickettsia* spp. en el 48%, 29,6%, 33,3%, 63% y 37% de las garrapatas, respectivamente.

- **Garrapatas identificadas como *D. marginatus***: De los 24 ejemplares de *D. marginatus* incluidos en este trabajo, en 22 (91,6%) se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. con la PCR semianidada del gen *ompA*, en 21 (87,5%) con la reacción anidada del gen *ompB*, y en 16 (66,6%) con la del gen *gltA*. En cuanto a las reacciones de PCR simples, con la PCR del gen ARNr 16S se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en 10 *D. marginatus* (41,6%); con la reacción de PCR del gen *gltA* (extremo 5') en 20 ejemplares (83,3%), y con la reacción de PCR que utiliza como diana el gen *htrA*, se detectó *Rickettsia* spp. en 7 *D. marginatus* (29,16%). Las reacciones de PCR simples de los genes *gltA* (región central), *ompA* y *ompB* permitieron detectar ADN de *Rickettsia* spp. en 5 (20,8%), 6 (25%) y 15 (62,5%) *D. marginatus*, respectivamente.
- **Garrapatas identificadas como *R. sanguineus***: En los tres ejemplares de *R. sanguineus* se consiguió detectar *Rickettsia* spp. mediante las tres reacciones de PCR secuenciales de los genes *gltA*, *ompA* y *ompB*, y con las reacciones de PCR simples de los genes ARNr 16S, *gltA* (región central y extremo 5'), *ompA* y *htrA*. La reacción de PCR simple del gen *ompB* permitió detectar *Rickettsia* spp. en dos de los tres ejemplares de *R. sanguineus*.

La detección de *Rickettsia* spp. en el 100% de las garrapatas de pacientes sintomáticos procesadas se consiguió mediante la combinación de las reacciones de PCR secuenciales de los genes *ompA* y *gltA*.

Tabla 39. Número de artrópodos (en orden creciente) retirados de pacientes en los que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. empleando diferentes métodos de PCR.

Tipo de PCR	Gen (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
PCR sencilla	<i>gltA</i> (c)	8 (29,6)
	<i>ompA</i>	9 (33,3)
	<i>htrA</i>	10 (37)
	ARNr 16S	13 (48)
	<i>ompB</i>	17 (63)
	<i>gltA</i> (5')	23 (85,1)
PCR secuencial	<i>gltA</i> **	19 (70,3)
	<i>ompB</i> **	24 (88)
	<i>ompA</i> *	25 (92,6)

(c): región central, (5'): extremo 5', **:PCR anidada, *: PCR semianidada

2.2. Amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. en las garrapatas de pacientes asintomáticos

Además de las 27 garrapatas retiradas de pacientes con rickettsiosis, en este trabajo se procesaron 18 garrapatas de pacientes que no desarrollaron enfermedad tras la picadura del artrópodo. Estas garrapatas fueron identificadas como *D. marginatus* (n=4), *H. marginatum* (n=8), *R. sanguineus* (n=3) y *R. bursa* (n=3). De estas 18 garrapatas, en 17 se consiguió detectar *Rickettsia* spp. con la reacción de PCR anidada del gen *ompB*. En la siguiente tabla se detalla el número y el porcentaje de garrapatas en las que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. con los diferentes métodos de PCR.

Tabla 40. Número de artrópodos de pacientes asintomáticos en los que se detectó ADN de *Rickettsia* spp. empleando diferentes métodos de PCR.

Tipo de PCR	Gen (región)	Nº de muestras en las que se detectó ADN de <i>Rickettsia</i> spp. (%)
PCR sencilla	<i>ompA</i>	2 (11,1)
	<i>gltA</i> (c)	3 (16,6)
	<i>htrA</i>	3 (16,6)
	ARNr 16S	7 (38,8)
	<i>gltA</i> (5')	7 (38,8)
	<i>ompB</i>	13 (72,2)
PCR secuencial	<i>ompA</i> *	7 (38,8)
	<i>gltA</i> **	12 (66,6)
	<i>ompB</i> **	17 (94,4)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada

Combinando las PCRs secuenciales de *gltA* y *ompB* se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en el 100% de garrapatas de pacientes asintomáticos.

En las garrapatas identificadas como *D. marginatus*, mediante la reacción de PCR simple del gen *ompB* se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en el 100% de las muestras. En el 75% de las muestras se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. con las reacciones de PCR simples de los genes ARNr 16S y *gltA* (extremo 5'), y con las reacciones de PCR secuenciales de los genes *gltA* y *ompA*. Mediante las reacciones de PCR simples de los genes *gltA* (región central), *ompA* y *htrA* sólo se consiguió detectar ADN de *Rickettsia* spp. en el 25% de las muestras.

En los 8 ejemplares de *H. marginatum* se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. utilizando la reacción de PCR simple del gen *ompB*. Mediante la reacción de PCR anidada del gen *gltA* se amplificó ADN de *Rickettsia* spp en el 75% de las muestras. Las reacciones de PCR simples de los genes ARNr 16S y *gltA* (extremo 5') permitieron detectar *Rickettsia* spp. en el 37,5% de los ejemplares de *H. marginatum*. En el 25% de estas muestras se detectó *Rickettsia* spp. con las reacciones de PCR simples de los genes *gltA* y *htrA*, y la reacción de PCR semianidada del gen *ompA*. La reacción de PCR simple del gen *ompA* no permitió detectar *Rickettsia* spp. en ninguna de estas garrapatas.

En el caso de *R. sanguineus*, fue con la reacción de PCR anidada del gen *gltA* con la que se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en el 100% de las muestras. Con las otras dos reacciones de PCR secuenciales (genes *ompA* y *ompB*) se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en el 66,6% de las muestras. Con las reacciones de PCR simples de los genes ARNr 16S, *gltA* (extremo 5') y *ompB* se detectó *Rickettsia* spp. en el 33,3% de *R. sanguineus*. Mediante las reacciones de PCR simples de los genes *gltA* y *htrA* no se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en estas garrapatas.

En los ejemplares de *R. bursa* procesados, sólo se consiguió detectar *Rickettsia* spp. mediante la reacción de PCR anidada del gen *ompB*, con la que se amplificó ADN de *Rickettsia* spp. en el 100% de estas garrapatas. Con el resto de las reacciones de PCR no se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. en los ejemplares de *R. bursa*.

3. UTILIDAD DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE PCR ANALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

3.1. Muestras clínicas de pacientes sintomáticos

Para determinar la validez de los métodos de PCR empleados en este trabajo para la identificación de especies, fue necesario conocer las diferentes especies de *Rickettsia* encontradas en las diferentes muestras.

Así, al utilizar las reacciones de PCR simples que tienen como diana los diferentes genes estudiados y proceder al análisis de las secuencias nucleotídicas, se encontró que:

Reacciones de PCR simples:

- **gen ARNr 16S:** Con el gen ARNr 16S, las secuencias nucleotídicas encontradas en 7 ejemplares de *D. marginatus*, mostraron máxima similitud (100%) con *R. peacockii* y *R. rickettsii*. El análisis de las secuencias nucleotídicas amplificadas en 2 *D. marginatus* reveló una homología del 100% con *R. slovacca*. En un *D. marginatus* se detectó, con una identidad del 100%, ADN de una bacteria no cultivada (uncultured bacteria DER 204). Mediante esta reacción de PCR también se detectó ADN de *R. conorii* (100% de identidad) en 3 *R. sanguineus*.
- **gen *gltA* (extremo 5')**: En una biopsia se amplificó ADN de *R. africae* (99,7% de similitud). El análisis de las secuencias nucleotídicas amplificadas en 20 ejemplares de *D. marginatus*, mostró una similitud entre el 98,7 y el 100% con *R. raoultii* y *R. slovacca*. Con unas similitudes en torno al 99,5% también se detectó en estos *D. marginatus* ADN de *Candidatus R. rioja*. En los 3 *R. sanguineus* se detectó, con una homología del 100%, ADN de *R. conorii*. En uno, también se amplificó una secuencia nucleotídica, cuyo análisis mostró una homología del 100% con *R. raoultii*.

- **gen *htrA***: El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en los 7 *D. marginatus* mostró un porcentaje de similitud entre 99,2 y 99,7% con *R. rickettsii*, en 4 de éstos también con *R. parkeri*, y en uno de ellos con *R. peacockii*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en los 3 ejemplares de *R. sanguineus* reveló una identidad del 99,5% con *R. conorii*.
- **gen *gltA* (región central)**: El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mostró una homología del 100% con *R. slovacica* en los ejemplares de *D. marginatus*, y del 99,7% con *R. conorii*, en *R. sanguineus*.
- **gen *ompA***: En una sangre completa con EDTA se detectó, con una homología del 100%, ADN de *R. conorii*. El ADN de esta *Rickettsia* sp. también se amplificó con una identidad del 99,2-99,3% en los 3 ejemplares de *R. sanguineus*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en los 5 *D. marginatus* mostró una homología del 100% con *R. slovacica*, y en un *D. marginatus* con *R. raoultii* (homología del 100%).
- **gen *ompB***: El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 7 *D. marginatus* mostró una similitud del 99,5-100% con *R. slovacica*. En 8 *D. marginatus*, el análisis de las secuencias nucleotídicas reveló una similitud del 98-99,8% con *R. raoultii* y, del 97,5-100% con *Candidatus* *R. rioja*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 2 *R. sanguineus* mostró una homología del 100% con *R. conorii*.

Reacciones de PCR secuenciales:

- **gen *gltA* (región central)**: El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida en una biopsia mostró una identidad del 99,1% con *R. massiliae*. El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida en una sangre completa con EDTA reveló una homología del 100% con *R. sibirica* subsp. *mongolitimoniae*. En 2 sueros, una capa eritrocitaria, un plasma, una sangre completa con EDTA y 3 *R. sanguineus* se detectó, con una máxima similitud entre 99,1-99,7%, ADN de *R. conorii*. Una identidad del 99,3-

100% con *R. felis*, fue lo que reveló el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 5 sangres completas con EDTA, 2 capas eritrocitarias y un suero. En 2 biopsias se detectó ADN de *R. africae*, en ambos casos, con un 99,4% de identidad. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en dos capas eritrocitarias, un suero, un plasma y 9 *D. marginatus* mostró máxima identidad (99,1-100%) con *R. slovacica*. En 5 *D. marginatus*, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mostró una identidad del 97,4-98% con *R. raoultii*, y del 99,4-100% con otra *Rickettsia* sp., denominada DmS1. En un *D. marginatus* se detectó ADN de *R. raoultii* (100% de homología). En otro de los *D. marginatus* en los que se amplificó ADN de *Rickettsia* sp. mediante esta reacción de PCR, el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida mostró una homología del 100% con *Rickettsia* sp. DmS1. Esta *Rickettsia* no es una especie validada y la *Rickettsia* sp. validada con la que esta secuencia mostró un alto grado de identidad fue *R. japonica* (98%). El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida en una muestra de sangre completa con EDTA mostró una identidad del 99,4% con *R. africae*, *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* y *R. honei* subsp. *marmionii*. Por último, el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida en una capa eritrocitaria reveló una identidad del 99,4% con *R. raoultii* y *R. sibirica* subsp. *sibirica*.

- **gen ompA:** El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en tres muestras de sangre completa con EDTA, un suero y tres *R. sanguineus* mostró una identidad del 99,7-100% con *R. conorii*. Una homología del 100% con *R. africae* reveló el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en dos biopsias. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 2 sangres completas con EDTA y 12 *D. marginatus* mostró una identidad del 99,4-100% con *Candidatus R. rioja*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 2 capas eritrocitarias y una capa leucocitaria reveló una identidad del 99,7% con *R. felis*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 8 *D. marginatus* mostró máxima identidad con *R. slovacica* (99,8-100%) y, en un ejemplar de *D. marginatus*, con *R. raoultii* (100%).

- **gen ompB:** El análisis de la secuencias nucleotídicas obtenidas en 4 capas eritrocitarias, 4 sangres completas con EDTA, 4 sueros, un plasma y 3 *R. sanguineus* mostró una similitud entre el 99,2 y el 100% con *R. conorii*. Una máxima identidad del 99,5% con *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* reveló el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida en una sangre completa con EDTA. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 2 biopsias mostró una identidad del 99,2-99,7% con *R. africae* y, en otra biopsia con *R. massilae* (similitud del 99,7%). El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en una muestra de sangre completa con EDTA, una capa leucocitaria, 2 capas eritrocitarias, un plasma, un suero y 9 *D. marginatus* mostró identidad de 98,4-99,5% con *R. slovacca*. En 8 muestras (una capa leucocitaria, 2 capas eritrocitarias y 5 sangres completas con EDTA) en las que también se amplificó ADN de *Rickettsia* sp., el análisis de la secuencias nucleotídicas obtenidas mostró una identidad de 98,8-99,5% con *R. conorii* y, del 99,2-100% con *R. slovacca*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 2 capas eritrocitarias, 2 capas leucocitarias y una sangre completa con EDTA reveló una identidad del 99,7% con *R. felis*. Por último, el análisis de la secuencia nucleotídica amplificada en 12 *D. marginatus* mostró una identidad del 98-99,8% con *R. raoultii* y, del 97,5-100% con *Candidatus R. rioja*.

En las siguientes tablas se pueden ver las especies de *Rickettsia* que mostraron mayor identidad (%) tras la secuenciación de los amplicones obtenidos.

Tabla 41. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 16 sangres completas con EDTA.

Sangre EDTA (n=16)	PCR simples						PCR secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> (100)	<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> (99,5)
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovacae</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8)	neg.	neg.
4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,1)	<i>R. conorii</i> (99,5)
5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,3)
6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)
7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)

Sangre EDTA (n=16)	PCR simples						PCR secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
8	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)	neg.	neg.
9	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (100)	neg.
10	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. africae</i> <i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> <i>R. honei</i> subsp. <i>marmioni</i> (99,4)	<i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)
11	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)	<i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)
12	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)

Sangre EDTA (n=16)	PCR simples						PCR secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
13	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)
14	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,6)	<i>R. felis</i> (99,4)	neg.
15	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)	<i>R. conorii</i> (99,7)
16	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)

(c): región central, (5'): extremo 5', *:PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*, *C.*: *Candidatus*

Tabla 42. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 12 muestras de capa eritrocitaria.

Capa eritrocitaria (n=12)	PCR simples						PCR secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,7)
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,5)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,7)
4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,4)	neg.
5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,4)	neg.
6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,1)	<i>R. slovaca</i> (100) <i>R. conorii</i> (99,5)
7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i> (99,4)	<i>R. slovaca</i> (99,5)

Capa eritocitaria (n=12)	PCR simples						PCR secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
8	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovacca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)
9	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)	<i>R. felis</i> (99,3)	<i>R. felis</i> (99,7)
10	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)	<i>R. felis</i> (99,4)	<i>R. felis</i> (99,7)
11	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99)
12	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovacca</i> (99,2)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*,

C.: *Candidatus*

Tabla 43. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 4 muestras de capa leucocitaria.

Capa leucocitaria (n=4)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,5)
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)	neg.	<i>R. felis</i> (99,7)
4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,2) <i>R. conorii</i> (98,8)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*

Tabla 44. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 2 muestras de plasma.

Plasma (n=2)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,1)	<i>R. conorii</i> (99,2)
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,4)	<i>R. slovaca</i> (98,4)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*

Tabla 45. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 biopsias.

Biopsia (n=3)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. africae</i> (100)	<i>R. africae</i> (99,4)	<i>R. africae</i> (99,2)
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. africae</i> (100)	<i>R. africae</i> (99,4)	<i>R. africae</i> (99,7)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. massiliae</i> (99,1)	<i>R. massiliae</i> (99,7)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*

Tabla 46. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 8 muestras de suero.

Suero (n=8)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)	neg.	neg.
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,1)	<i>R. conorii</i> (99,5)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,5)
4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,5)
5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (100)
6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. conorii</i> (99,1)	neg.
7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99)	neg.
8	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (98,5)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*

Tabla 47. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 24 *D. marginatus* retirados de pacientes con rickettsiosis.

<i>D. marginatus</i> (n=24)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	<i>R. peacockii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. peacockii</i> <i>R. rickettsii</i> <i>R. parkeri</i> (99,7)	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,8)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)
2	<i>R. peacockii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. rickettsii</i> (99,5)	<i>R. raoultii</i> , <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,2)
3	<i>R. peacockii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. rickettsii</i> <i>R. parkeri</i> (99,5)	<i>R. raoultii</i> , <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (98,9)

<i>D. marginatus</i> (n=24)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
4	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> (99)	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)	<i>C. R. rioja</i> (100)	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)
5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,4)	neg.	<i>R. raoultii</i> (99,5) <i>C. R. rioja</i> (99,2)
6	Uncultured bacteria (100)	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> (99,4)	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100) <i>R. raoultii</i> (99,3)	<i>C. R. rioja</i> (100)	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100) <i>R. raoultii</i> (99,3)
7	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,4) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> (99)	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)	<i>C. R. rioja</i> (100)	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)

<i>D. marginatus</i> (n=24)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
8	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> (99)	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100)	<i>R. sp. DmS1</i> (99,4) <i>R. raoultii</i> (97,6)	<i>R. raoultii</i> (99) <i>C. R. rioja</i> (98,8)
9	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> <i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> (99)	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100)	<i>R. sp. DmS1</i> (99,4) <i>R. raoultii</i> (97,6)	<i>R. raoultii</i> (99,2) <i>C. R. rioja</i> (99)
10	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> <i>C. R. rioja</i> (99,7)	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,3) <i>R. raoultii</i> (98,9)	<i>C. R. rioja</i> (100)	<i>R. raoultii</i> (100)	<i>C. R. rioja</i> (99,3) <i>R. raoultii</i> (98,9)
11	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovacca</i> <i>C. R. rioja</i> (99,7)	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> (99,8) <i>C. R. rioja</i> (99,3)	neg.	<i>R. sp. DmS1</i> (100) <i>R. japonica</i> (98)	<i>R. raoultii</i> (99,8) <i>C. R. rioja</i> (99,3)
12	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. sp. DmS1</i> (98,8) <i>R. raoultii</i> (97)	neg.

<i>D. marginatus</i> (n=24)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
13	<i>R. peackokii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	neg.	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)
14	<i>R. peackokii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. rickettsii</i> (99,5)	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)
15	<i>R. peackokii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. rickettsii</i> (99,5)	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,5)
16	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	<i>R. raoultii</i> (100)	neg.	<i>R. raoultii</i> (98) C. R. rioja (97,5)	<i>R. raoultii</i> (100)	neg.	<i>R. raoultii</i> C. R. rioja (97,7)

<i>D. marginatus</i> (n=24)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
17	<i>R. peacockii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. rickettsii</i> <i>R. parkerii</i> (99,5)	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,1)	<i>R. slovaca</i> (100)
18	neg.	neg.	C. R. rioja (99,7) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (99)	neg.	neg.	C. R. rioja (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)	C. R. rioja (99,8)	neg.	C. R. rioja (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)
19	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	C. R. rioja (100)	R. sp. DmS1 (99,4) <i>R. raoultii</i> (97,6)	neg.
20	<i>R. slovaca</i> (100)	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	neg.	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,4)	<i>R. slovaca</i> (100)

<i>D. marginatus</i> (n=24)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
21	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (98,9)	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100)	<i>R. sp. DmS1</i> (99,4) <i>R. raoultii</i> (97,6)	<i>C. R. rioja</i> <i>R. raoultii</i> (99,5)
22	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,2) <i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (98,7)	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)	<i>C. R. rioja</i> (100)	neg.	<i>C. R. rioja</i> (99,8) <i>R. raoultii</i> (99,2)
23	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>C. R. rioja</i> (100)	neg.	neg.
24	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. rickettsii</i> <i>R. parkeri</i> (99,2)	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>C. R. rioja</i> (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,3)	<i>R. slovaca</i> (99,5)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *R.*: *Rickettsia*, *C.*: *Candidatus*

Tabla 48. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 *R. sanguineus* retirados de pacientes con rickettsiosis.

<i>Rh. sanguineus</i> (n=3)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,5)	<i>R. conorii</i> <i>R. raoultii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,3)	<i>R. conorii</i> (99,7)	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,7)	<i>R. conorii</i> (100)
2	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,5)	<i>R. conorii</i> <i>R. raoultii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,3)	<i>R. conorii</i> (99,7)	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,7)	<i>R. conorii</i> (100)
3	<i>R. conorii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,5)	<i>R. conorii</i> <i>R. raoultii</i> (100)	<i>R. conorii</i> (99,2)	<i>R. conorii</i> (99,7)	neg.	<i>R. conorii</i> (99,8)	<i>R. conorii</i> (99,7)	<i>R. conorii</i> (100)

(c): región central, (5'): extremo 5', *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *Rh.*: *Rhipicephalus*, *R.*: *Rickettsia*

3.1.1. Síndromes

De los 52 pacientes de los que se incluyeron muestras en este trabajo, en 26 el diagnóstico clínico fue de DEBONEL, en 24 de fiebre exantemática y dos pacientes sólo presentaron fiebre tras referir haber sido picados por garrapatas [excepto en dos de ellos, que referían haber sido picados por pulgas y trombicúlidos (pacientes 24 y 25)].

En la tabla 49 se detallan las especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos con cada uno de los métodos de PCR en las muestras de los 52 pacientes.

Pacientes con DEBONEL/TIBOLA

El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida en la sangre de un paciente con DEBONEL/TIBOLA mostró una similitud del 99,8% con *Candidatus R. rioja* (gen *ompA*) (paciente 4). En otro paciente (nº 23), el análisis de la secuencias nucleotídicas obtenidas, reveló una identidad del 99,4% con *R. felis* (gen *gltA*) y, del 99,8% con *Candidatus R. rioja* (gen *ompA*). En los 3 pacientes (pacientes 1, 26 y 28) en los que se detectó ADN de *Rickettsia* tanto en la sangre como en la garrapata, el análisis de la secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la sangre mostró una identidad de entre el 99 y el 99,7% (según el paciente) con *R. conorii* (gen *ompB*), mientras que el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en las garrapatas de los 3 pacientes, mostró una identidad del 97,7-100% con *Candidatus R. rioja*, del 97,6-100% con *R. raoultii* y, del 99-100% con *R. slovacica* [genes *ompA*, *ompB* y *gltA* (extremo5')]. El análisis de la secuencia nucleotídica amplificada en la garrapata de uno de ellos (paciente 28) también reveló un alto grado de identidad (99,4%) con *Rickettsia* sp. DmS1 [gen *gltA* (región central)].

En 21 pacientes con DEBONEL/TIBOLA (pacientes 30-50), sólo se consiguió amplificar ADN de *Rickettsia* spp. en la garrapata. En cinco de estos pacientes (31, 40, 41, 42 y 46), el análisis de la secuencia nucleotídica amplificada en la garrapata mostró una identidad del 100% con *R. peacockii* y *R. rickettsii* (gen ARNr 16S); del 100% con *R. raoultii* y *R. slovacica*, y del 99,5% con *Candidatus R. rioja* [gen *gltA* (extremo5')]; del 100% con *R. slovacica* [genes *gltA* (región central) y *ompA*]; y del 99,2-100% también con *R. slovacica* mediante el método de PCR del gen *ompB*. En los pacientes 31, 41 y 42 el análisis de la secuencia

nucleotídica obtenida mediante la PCR del gen *htrA* reveló una identidad del 99,5% con *R. rickettsii*. En otros cuatro pacientes (30, 32, 43 y 50), el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la PCR del gen *htrA* reveló, además de un alto grado de identidad con las especies de rickettsia antes descritas (*R. peacockii*, *R. rickettsii*, *R. raoultii*, *R. slovacica*, *Candidatus R. rioja*), una similitud del 99,2-99,5%, con *R. parkeri*. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en las garrapatas de 4 pacientes (33, 37, 44 y 48) mostró una identidad del 99,2-100% con *Candidatus R. rioja* y del 98,7-100% con *R. raoultii* y *R. slovacica* [genes *gltA*(extremo 5' y región central), *ompA* y *ompB*]. El análisis de las secuencias nucleotídicas amplificadas en otras 4 garrapatas reveló un alto grado de similitud con dos especies de *Rickettsia* no validadas hasta el momento: Uncultured bacteria DER 204 (100%, gen ARNr 16S) en la garrapata del paciente 35, y *Rickettsia* sp. DmS1 (99,4%; gen *gltA* región central) en los pacientes 36, 38 y 47. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el método de PCR de la región central del gen *gltA*, en las garrapatas de los pacientes 39 y 45 mostró una similitud del 98,8% y del 99,4% con *Rickettsia* sp. DmS1, respectivamente. Estas secuencias nucleotídicas obtenidas en estas dos garrapatas también mostraron una alta identidad con *R. raoultii* (paciente 39), y *R. raoultii* y *Candidatus R. rioja* (paciente 45). En estos pacientes, en los que el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir del método de PCR que utiliza como diana la región central del gen *gltA* mostró un alto grado de identidad con *Rickettsia* sp. DmS1, la especie de *Rickettsia* validada en GenBank con la que se obtuvo un mayor grado de identidad fue *R. raoultii* (97-97,6%; pacientes 36, 39, 45 y 47) o *R. japonica* (98%; paciente 38).

El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida a partir de la garrapata del paciente 34, mostró una similitud del 99,5% con *R. raoultii* (gen *ompB*) y del 99,2-99,4% con *Candidatus R. rioja* (genes *ompA* y *ompB*). El análisis nucleotídico de la secuencia obtenida en la garrapata del paciente 49 (gen *ompA*) reveló homología (100% identidad) con *Candidatus R. rioja*.

Pacientes con Fiebre exántemica

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en 7 de los 24 pacientes (5, 6, 7, 9, 11, 13, y 16) mostró un alto grado de identidad con *R. conorii*. Los

porcentajes de similitud encontrados fueron: 99,1 a 99,4% [gen *gltA* (región central)]; 99,2 a 100% (gen *ompB*) y 100% (gen *ompA*).

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas en dos garrapatas de pacientes con fiebre exantemática (pacientes 51 y 52) reveló una identidad entre 99,5-100%, con *R. conorii* [genes ARNr 16S, *gltA* (región central y extremo 5'), *htrA*, *ompA* y *ompB*]. El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida mediante el método de PCR del extremo 5' del gen *gltA*, también reveló una identidad del 100% con *R. raoultii*.

En el paciente n° 10, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la muestra de suero, mostró una identidad del 99,5% con *R. conorii* (gen *ompB*), y del 100% con *R. felis* [gen *gltA* (región central)]. En otro paciente (n° 17), el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la capa eritrocitaria, mostró un alto grado de identidad con *R. slovacae* [99,1%; gen *gltA* (región central) y 100% (gen *ompB*)], y con *R. conorii* [99,5% (gen *ompB*)].

El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida a partir de la capa eritrocitaria de el paciente 14 reveló una similitud del 99,4% con *R. slovacae* [gen *gltA* (región central)].

En 3 pacientes (2, 21 y 27), el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la PCR del gen *ompB*, mostró una identidad del 98,5 al 99,5% con *R. slovacae*, y del 98,8 al 99% con *R. conorii*.

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de las biopsias de los pacientes con fiebre exantemática, mostró un alto grado de similitud con *R. africae* (pacientes 12 y 29), y con *R. massiliae* (paciente 22). Los porcentajes de similitud en el caso de *R. africae* fueron del 99,4% [gen *gltA* (región central)], 99,7% [gen *gltA* (extremo 5')], 100% (gen *ompA*) y 99,2-99,7% (gen *ompB*). En el caso de la biopsia en la que se detectó ADN de *R. massiliae*, los porcentajes de similitud fueron de 99,1% [gen *gltA* (región central)] y 99,7% (gen *ompB*).

El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de las muestras clínicas de los pacientes 15, 24 y 25, mostró un alto grado de identidad con *R. felis*: 99,3-100% [gen *gltA* (región central)] y 99,7% (genes *ompA* y *ompB*).

En 2 pacientes (19 y 20), el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas, mostró una identidad del 99,7 al 100% con *R. felis* [gen *gltA* (región central)], y del 99,5% y 99% con *R. slovacica* y *R. conorii* (gen *ompB*), respectivamente.

Por último, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el método de PCR de la región central del gen *gltA*, a partir de las muestras del paciente 18, mostró una identidad del 99 al 99,4% con *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *R. africae*, *R. honei* subsp. *marmionii*, *R. slovacica*, y *R. sibirica* subsp. *sibirica*. En cambio, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el método de PCR del gen *ompB*, reveló una similitud del 98,4 al 99,5% con *R. slovacica*, y del 99% *R. conorii*.

Pacientes con Fiebre

Dos pacientes mostraron fiebre como único signo de enfermedad tras la picadura de garrapata, el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida a partir de la sangre del paciente nº 2, mostró una identidad del 100% (gen *gltA*) y del 99,5% (gen *ompB*) con *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae*. El análisis de la secuencia nucleotídica detectada en la sangre del paciente nº 8 reveló una homología del 100% con *R. conorii* (gen *ompB*).

En la siguiente tabla se pueden ver los 52 pacientes incluidos en este trabajo, sus síndromes, y las especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos con cada uno de los métodos de PCR.

Tabla 49. Síndromes y especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos con cada uno de los métodos de PCR en las muestras de los 52 pacientes.

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
1	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	<i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (99,7)	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) <i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>ompA</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. raoultii</i> (97,7) <i>C. R. rioja</i> (97,7)
2	Fiebre	<i>gltA</i> central <i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> (99,5)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
3	Fiebre exantemática	<i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)	neg.	<i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5)	neg.	neg.	ND	ND

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
4	DEBONEL/ TIBOLA	<i>ompA</i> C. R. rioja (99,8)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
5	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>ompA</i> R. conorii (100)	ND	ND
6	Fiebre exantemática	<i>gltA</i> central R. conorii (99,1) <i>ompA</i> R. conorii (100) <i>ompB</i> R. conorii (99,5)	neg.	neg.	neg.	<i>gltA</i> central R. conorii (99,1) <i>ompB</i> R. conorii (99,5)	neg.	ARNr 16S, <i>ompB</i> , <i>gltA</i> 5' R. conorii (100) <i>htrA</i> R. conorii (99,5) <i>gltA</i> central R. conorii (99,7) <i>ompA</i> R. conorii (99,8)
7	Fiebre exantemática	<i>ompB</i> R. conorii (99,3)	neg.	neg.	<i>ompB</i> R. conorii (99,5)	<i>ompB</i> R. conorii (99,5)	ND	ND
8	Fiebre	<i>ompB</i> R. conorii (100)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
9	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	<i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (99,7)	neg.	ND	ND
10	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (99,5) <i>gltA</i> central <i>R. felis</i> (100)	ND	ND
11	Fiebre exantemática	<i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (100)	neg.	neg.	neg.	<i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (100)	ND	ND
12	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>gltA</i> central <i>R. africae</i> (99,4) <i>gltA</i> 5' <i>R. africae</i> (99,7) <i>ompA</i> <i>R. africae</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. africae</i> (99,2)	ND
13	Fiebre exantemática	<i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (100)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
14	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	<i>gltA</i> central <i>R. slovaca</i> (99,4)	neg.	ND	ND

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
15	Fiebre exantemática	<i>gltA</i> central <i>R. felis</i> (100)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
16	Fiebre exantemática	neg.	<i>gltA</i> central <i>R. conorii</i> (99,1) <i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (99,2)	neg.	<i>gltA</i> central <i>R. conorii</i> (99,4)	<i>gltA</i> central <i>R. conorii</i> (99,1)	ND	ND
17	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	<i>gltA</i> central <i>R. slovaca</i> (99,1) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>R. conorii</i> (99,5)	neg.	ND	ND
18	Fiebre exantemática	<i>gltA</i> central <i>R. africae</i> (99,4) <i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimonae</i> (99,4) <i>R. honei</i> subsp. <i>marmioni</i> (99,4) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)	<i>gltA</i> central <i>R. slovaca</i> (99,4) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (98,4)	neg.	<i>gltA</i> central <i>R. raoultii</i> (99,4) <i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i> (99,4) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5)	<i>gltA</i> central <i>R. slovaca</i> (99)	ND	ND

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
19	Fiebre exantemática	<i>gltA</i> central <i>R. felis</i> (99,7) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
20	Fiebre exantemática	<i>gltA</i> central <i>R. felis</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
21	Fiebre exantemática	<i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)	neg.	neg.	<i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)	<i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (98,5)	ND	ND
22	Fiebre exantemática	ND	ND	ND	ND	ND	<i>gltA</i> central <i>R. massiliae</i> (99,1) <i>ompB</i> <i>R. massiliae</i> (99,7)	ND

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
23	DEBONEL/ TIBOLA	<i>gltA</i> central R. felis (99,4) <i>ompA</i> C. R. rioja (99,8)	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ND
24	Fiebre exantemática	neg.	neg.	<i>ompB</i> R. felis (99,7)	<i>gltA</i> central R. felis (99,3) <i>ompA, ompB</i> R. felis (99,7)	neg.	ND	ND
25	Fiebre exantemática	<i>gltA</i> central, <i>ompB</i> R. felis (99,7)	neg.	<i>ompA, ompB</i> R. felis (99,7)	<i>gltA</i> central R. felis (99,4) <i>ompA, ompB</i> R. felis (99,7)	neg.	ND	ND
26	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	<i>ompB</i> R. conorii (99)	neg.	ND	<i>gltA</i> 5' C. R. rioja (99,4) R. raoultii (99) R. slovacae (99) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> C. R. rioja (99,8) R. raoultii (99,2)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
27	Fiebre exantemática	<i>ompB</i> R. slovaca (99,5) R. conorii (99)	neg.	<i>ompB</i> R. slovaca (99,2) R. conorii (98,8)	neg.	neg.	ND	ND
28	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	<i>ompB</i> R. slovaca (99,2)	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> C. R. rioja (99,5) R. raoultii (99) R. slovaca (99) <i>gltA central</i> R. sp.DmS1 (99,4) R. raoultii (97,6) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> R. raoultii (99) C. R. rioja (98,8)
29	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>gltA central</i> R. africae (99,4) <i>ompA</i> R. africae (100) <i>ompB</i> R. africae (99,7)	ND

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
30	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) <i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>htrA</i> <i>R. peacockii</i> (99,7) <i>R. rickettsii</i> (99,7) <i>R. parkerii</i> (99,7) <i>gltA central</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompA</i> <i>R. slovaca</i> (99,8) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (100)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
31	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) <i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>htrA</i> <i>R. rickettsii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompA</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,2)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
32	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) <i>C. R. rioja</i> (99,5) <i>htrA</i> <i>R. rickettsii</i> (99,5) <i>R. parkerii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompA</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (98,9)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
33	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> C. R. rioja (99,5) R. raoultii (99) R. slovacá (99) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> C. R. rioja (99,8) R. raoultii (99,2)
34	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>ompA</i> C. R. rioja (99,4) <i>ompB</i> R. raoultii (99,5) C. R. rioja (99,2)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
35	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S uncultured bacteria (100) <i>gltA 5'</i> C. R. rioja (100) R. raoultii (99,4) R. slovaca (99,4) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> C. R. rioja (100) R. raoultii (99,3)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
36	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> C. R. rioja (99) R. raoultii (99) R. slovacá (99) <i>gltA central</i> R. sp. DmS1 (99,4) R. raoultii (97,6) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> R. raoultii (99,2) C. R. rioja (99)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
37	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (99,7) <i>R. slovacica</i> (99,7) <i>C. R. rioja</i> (99,7) <i>gltA central</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>ompA</i> <i>C. R. rioja</i> (100) <i>ompB</i> <i>C. R. rioja</i> (99,3) <i>R. raoultii</i> (98,9)
38	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (99,7) <i>R. slovacica</i> (99,7) <i>C. R. rioja</i> (99,7) <i>gltA central</i> <i>R. sp. DmS1</i> (100) <i>R. japonica</i> (98) <i>ompB</i> <i>R. raoultii</i> (99,8) <i>C. R. rioja</i> (99,3)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
39	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA</i> central R. sp. DmS1 (98,8) R. raoultii (97)
40	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S R. peacockii (100) R. rickettsii (100) <i>gltA 5'</i> R. raoultii (100) R. slovaca (100) C. R. rioja (99,5) <i>gltA</i> central R. slovaca (100) <i>ompA, ompB</i> R. slovaca (100)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
41	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5) <i>htrA</i> <i>R. rickettsii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompA, ompB</i> <i>R. slovaca</i> (100)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
42	DEBONEL/ TIBOLA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5) <i>htrA</i> <i>R. rickettsii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompA</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
43	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5) <i>htrA</i> <i>R. rickettsii</i> (99,5) <i>R. parkerii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompA, ompB</i> <i>R. slovaca</i> (100)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
44	DEBONEL/ TIBOLA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<i>gltA 5'</i> C. R. rioja (99,7) R. raoultii (99) R. slovacá (99) <i>ompA</i> C. R. rioja (99,8) <i>ompB</i> C. R. rioja (99,8) R. raoultii (99,2)
45	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA central</i> R. sp. DmS1 (99,4) R. raoultii (97,6) <i>ompA</i> C. R. rioja (100)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
46	DEBONEL/ TIBOLA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5) <i>gltA</i> central, <i>ompA</i> y <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (100)
47	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> C. R. rioja (99,5) <i>R. raoultii</i> (98,9) <i>R. slovaca</i> (98,9) <i>gltA</i> central R. sp. DmS1 (99,4) <i>R. raoultii</i> (97,6) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> C. R. rioja (99,5) <i>R. raoultii</i> (99,5)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
48	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>gltA 5'</i> C. R. rioja (99,2) R. raoultii (98,7) R. slovaca (98,7) <i>ompA</i> C. R. rioja (100) <i>ompB</i> C. R. rioja (99,8) R. raoultii (99,2)
49	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	<i>ompA</i> C. R. rioja (100)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
50	DEBONEL/ TIBOLA	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S <i>R. peacockii</i> (100) <i>R. rickettsii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. raoultii</i> (100) <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5) <i>htrA</i> <i>R. rickettsii</i> (99,2) <i>R. parkerii</i> (99,2) <i>gltA</i> central, <i>ompA</i> <i>R. slovaca</i> (100) <i>ompB</i> <i>R. slovaca</i> (99,5)

Pac.	Síndrome	Muestras clínicas						
		Sangre con EDTA	Plasma	Cp. leucocitaria	Cp. eritrocitaria	Suero	Biopsia	Garrapata
51	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S, <i>ompA</i> , <i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. conorii</i> (100) <i>R. raoultii</i> (100) <i>htrA</i> <i>R. conorii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. conorii</i> (99,7)
52	Fiebre exantemática	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	ND	ARNr 16S, <i>ompA</i> , <i>ompB</i> <i>R. conorii</i> (100) <i>gltA 5'</i> <i>R. conorii</i> (100) <i>R. raoultii</i> (100) <i>htrA</i> <i>R. conorii</i> (99,5) <i>gltA central</i> <i>R. conorii</i> (99,7)

Pac: Pacientes, Cp: Capa, *R.*: *Rickettsia*, *C.*: *Candidatus*, DEBONEL/TIBOLA: Linfadenopatía, eritema y necrosis transmitida por *Dermacentor*/Linfadenopatía transmitida por garrapatas, neg: resultado de PCR negativo, ND: no disponible.

3.2 Garrapatas de pacientes asintomáticos

Como se ha mencionado en el apartado de material y métodos, en este trabajo además de las 72 muestras clínicas de pacientes con rickettsiosis, se procesaron 18 garrapatas de pacientes asintomáticos. Estas garrapatas fueron clasificadas como:

- 4 *D. marginatus*
- 8 *H. marginatum*
- 3 *R. sanguineus*
- 3 *R. bursa*

En las siguientes tablas se pueden ver las diferentes especies de *Rickettsia* con mayor grado de identidad tras secuenciar los productos de PCR obtenidos con los diferentes ensayos de PCR [genes ARNr 16S, *gltA* (región central y extremo 5'), *htrA*, *ompA* y *ompB*] en las 18 garrapatas retiradas de personas que no desarrollaron enfermedad.

Tabla 50. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%), tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de *D. marginatus* de pacientes asintomáticos.

<i>D. marginatus</i> (n=4)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	<i>R. peackokii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (100)	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,4)	<i>R. slovaca</i> (100)
2	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> C. R. rioja (99,7)	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> (98,9) C. R. rioja (98,3)	C. R. rioja (99,8)	neg.	<i>R. raoultii</i> (98,9) C. R. rioja (98,3)
3	<i>R. peackokii</i> <i>R. rickettsii</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (99,7)	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)	<i>R. slovaca</i> (100)
4	<i>R. peackokii</i> <i>R. rickettsii</i> (99,5)	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. slovaca</i> (100) C. R. rioja (99,5)	neg.	neg.	C. R. rioja (99,3) <i>R. raoultii</i> (98,9)	<i>R. raoultii</i> (100) C. R. rioja (98)	<i>R. raoultii</i> (99,4)	C. R. rioja (99,3) <i>R. raoultii</i> (98,9)

D.: *Dermacentor*, (5'): extremo 5', (c): región central, *R.*: *Rickettsia*, *C.*: *Candidatus*, *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo.

Tabla 51. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 8 *H. marginatum* retirados de pacientes asintomáticos.

<i>H. marg.</i> (n=8)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	<i>R. aeschlimannii</i> (100)	<i>R. sp. Hymarg</i> (97,9) <i>R. slovacica</i> (96)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,7)	neg.	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,6)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,8)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)
2	<i>R. aeschlimannii</i> (100)	<i>R. sp. Hymarg</i> (95) <i>R. parkeri</i> (94)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,7)	neg.	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,6)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,8)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. aeschlimannii</i> (98,8)	neg.	<i>R. raoultii</i> (99,4) <i>R. aeschlimannii</i> (99,1)	<i>R. aeschlimannii</i> (98,8)
4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)	neg.	<i>R. conorii</i> (99,4)	<i>R. aeschlimannii</i> (99,5)
5	<i>R. felis</i> (100)	neg.	<i>R. felis</i> (98,7)	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (98,1)	neg.	<i>R. raoultii</i> <i>R. aeschlimannii</i> (95,6)	<i>R. felis</i> (98)

<i>H. marg.</i> (n=8)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. aeschlimannii</i> (98,8)	neg.	<i>R. raoultii</i> (99,4) <i>R. aeschlimannii</i> (99,1)	<i>R. aeschlimannii</i> (98,8)
7	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,5)	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99,5)
8	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> (99,2) <i>C. R. rioja</i> (99)	neg.	neg.	<i>R. raoultii</i> (99,2) <i>C. R. rioja</i> (99)

H. marg.: *Hyalomma marginatum*, (5'): extremo 5', (c): región central, *: PCR semianidada, **: PCR anidada, *R.*: *Rickettsia*, *C.*: *Candidatus*,
neg.: resultado de PCR negativo.

Tabla 52. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 *R. sanguineus* retirados de pacientes asintomáticos.

<i>Rh. sanguineus</i> (n=3)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. massiliae</i> (99,1)	<i>R. massiliae</i> (99,2)
2	<i>R. massiliae</i> (100)	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. massiliae</i> (100)	<i>R. massiliae</i> (100)	<i>R. massiliae</i> (99,1)	<i>R. massiliae</i> (100)
3	neg.	neg.	<i>R. massiliae</i> (100)	<i>R. massiliae</i> (99,4)	neg.	neg.	<i>R. massiliae</i> (99,4)	<i>R. massiliae</i> (99,1)	neg.

(5'): extremo 5', (c): región central, *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *Rh.*: *Rhipicephalus*, *R.*: *Rickettsia*

Tabla 53. Especies de *Rickettsia* que mostraron máxima identidad (%) tras secuenciar los productos de PCR obtenidos a partir de 3 *R. bursa* retirados de pacientes asintomáticos.

<i>Rh. bursa</i> (n=3)	PCRs simples						PCRs secuenciales		
	ARNr 16S	<i>htrA</i>	<i>gltA</i> (5')	<i>ompA</i>	<i>gltA</i> (c)	<i>ompB</i>	<i>ompA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompB</i> **
1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. slovaca</i> (99,5) <i>R. conorii</i> (99)
2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. felis</i> (99)
3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	<i>R. massiliae</i> (99,2)

(5'): extremo 5', (c): región central, *: PCR semianidada, **: PCR anidada, neg.: resultado de PCR negativo, *Rh.*: *Rhipicephalus*, *R.* : *Rickettsia*.

4. SECUENCIAS INTRODUCIDAS EN GenBank

4.1. Secuencia nucleotídica de *R. slovacica* (gen ARNr 16S)

Rickettsia slovacica isolate DER271 16S ribosomal RNA, partial sequence

GenBank: JQ740394.1

LOCUS JQ740394 396 bp rRNA linear BCT 29-MAY-2012

DEFINITION *Rickettsia slovacica* isolate DER271 16S ribosomal RNA, partial sequence.

ACCESSION JQ740394

VERSION JQ740394.1 GI:388482862

KEYWORDS .

SOURCE *Rickettsia slovacica*

ORGANISM [Rickettsia slovacica](#)

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

REFERENCE 1 (bases 1 to 396)

AUTHORS Santibanez, S., Portillo, A., Ibarra, V., Santibanez, P., Blanco, J.R. and Oteo, J.A.

TITLE Unspecificity of 16S rDNA and 17kDa protein genes to amplify *Rickettsia* in *Dermacentor marginatus* from DEBONEL patients

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 396)

AUTHORS Santibanez, S., Portillo, A., Ibarra, V., Santibanez, P., Blanco, J.R. and Oteo, J.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-MAR-2012) Infectious Diseases Area, Hospital San Pedro-CIBIR, C/Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..396

/organism="Rickettsia slovacica"

/mol_type="rRNA"

/isolate="DER271"

/isolation_source="engorged female Dermacentor

marginatus

attached to a DEBONEL patient"

/host="Dermacentor marginatus"

/db_xref="taxon:35794"

/country="Spain"

/collection_date="11-Dec-2006"

rRNA <1..>396

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 aacgaacgct atcggatgct ttaacacatg caagtcgaac ggactaattg gggcttgctc
61 caattagtta gtggcagacg ggtgagtaac acgtgggaat ctacccatca gtacggaata
121 acttttagaa ataaaagcta ataccgata ttctctgctg aggaaagatt tatcgctgat
181 ggatgagccc gcgtcagatt aggtagttgg tgaggtaatg gtcaccaag cgcacgatct
241 gtagctggtc tgagaggatg atcagccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac
301 gggaggcagc agtggggaat attggacaat gggcgaaagc ctgatccagc aataccgagt
361 gagtgatgaa ggccttaggg ttgtaaagct ctttta

```

4.2. Secuencia nucleotídica de *R. slovacica* (gen *htrA*)

Rickettsia slovacica isolate DER271 17-kDa antigen gene, partial cds

GenBank: JQ740395.1

LOCUS JQ740395 395 bp DNA linear BCT 29-MAY-2012
 DEFINITION *Rickettsia slovacica* isolate DER271 17-kDa antigen gene, partial cds.
 ACCESSION JQ740395
 VERSION JQ740395.1 GI:388482863
 KEYWORDS .
 SOURCE *Rickettsia slovacica*
 ORGANISM [Rickettsia slovacica](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; Rickettsieae; Rickettsia; spotted fever group.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 395)
 AUTHORS Santibanez, S., Portillo, A., Ibarra, V., Santibanez, P., Blanco, J.R. and Oteo, J.A.
 TITLE Unspecificity of 16S rDNA and 17kDa protein genes to amplify *Rickettsia* in *Dermacentor marginatus* from DEBONEL patients
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 395)
 AUTHORS Santibanez, S., Portillo, A., Ibarra, V., Santibanez, P., Blanco, J. and Oteo, J.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-MAR-2012) Infectious Diseases Area, Hospital San Pedro-CIBIR, C/Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..395
 /organism="Rickettsia slovacica"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="DER271"
 /isolation_source="engorged female *Dermacentor marginatus* attached to a DEBONEL patient"
 /host="Dermacentor marginatus"
 /db_xref="taxon:35794"
 /country="Spain"
 /collection_date="11-Dec-2006"
 CDS <1..>395
 /codon_start=2
 /transl_table=11
 /product="17-kDa antigen"
 /protein_id="AFK33199.1"
 /db_xref="GI:388482864"
 /translation="QACNGPGGMNKQGTGTLGGAGGALLGSQFGKKGQLVGVGVGALLGAVLGGQIGTGMD
 EQDRRLAELTSQRALETAPSGSNVEWRNPDNGNYGYVTPNKTRNSTGQYCREYTQTVVI GGGKQKAYGNAC"

ORIGIN

```
1 acaagcctgt aacgggccgg gcggtatgaa taaacaaggt acaggaacac ttcttgccgg
61 tgctggcggc gcattacttg gttctcaatt cggtaagggc aaaggacagc ttgttgaggt
121 aggtgtaggt gcattacttg gacgagttct tgggggacaa atcggtagag gtatggatga
181 acaggataga agacttgacg agcttacctc acagagagct ttagaaacag ctcttagtgg
241 tagtaacgta gaatggcgta atccggataa cggcaattac ggttacgtaa cacctaataa
301 aacttataga aatagcactg gtcaatattg ccgtgagtac actcaaacag ttgtaatagg
361 cggaaaacaa caaaaagcat acggtaatgc atgct
```


4.3. Secuencia nucleotídica de una bacteria no cultivada DER 204 (gen ARNr 16S)

Uncultured bacterium isolate DER-204-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GQ404432.1

LOCUS GQ404432 398 bp DNA linear ENV 09-SEP-2009

DEFINITION Uncultured bacterium isolate DER-204-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GQ404432

VERSION GQ404432.1 GI:257136323

KEYWORDS ENV.

SOURCE uncultured bacterium

ORGANISM [uncultured bacterium](#)

Bacteria; environmental samples.

REFERENCE 1 (bases 1 to 398)

AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.

TITLE Candidatus Rickettsia rioja from Spain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 398)

AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-JUL-2009) Area of Infectious Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR,C/ Piqueras, 98, Logrono,La Rioja 26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..398

/organism="uncultured bacterium"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="DER-204-2"

/isolation_source="engorged female tick attached to a male DEBONEL patient"

/host="Dermacentor marginatus Der-204"

/db_xref="taxon:[77133](#)"

/environmental_sample

/country="Spain: Aguilar del Rio Alhama, La Rioja"

/collection_date="27-Oct-2005"

note="host also infected with Candidatus Rickettsia rioja"

rRNA <1..>398

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 agtgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagttgaac ggaaataatt ggtgcttgca
61 ctgattattt tagtggcaaa cgggtgagta atacatggga atctaccttg cagtacggaa
121 taactattgg aaacaagagc taataccgta tattgccgag aggtgaaaga tttatcgcta
181 caagatgagc ccatgcaaga ttagctagtt ggtgaggtaa atgcttacca aggctacgat
241 ctttagctgg tctgagagga tgatcagcca cactggaact gagacacggt ccagactcct
301 acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca gcgacgtcgc
361 gtgagtgaag aaggccttcg gggtgtaaag ctctttca
```

4.4. Secuencia nucleotídica de *Candidatus R. rioja* (gen *gltA*)

Candidatus Rickettsia rioja isolate DER-204-1 citrate synthase (*gltA*) gene, partial cds

GenBank: GQ404430.1

GQ404430 800 bp DNA linear BCT 08-SEP-2009

DEFINITION Candidatus Rickettsia rioja isolate DER-204-1 citrate synthase (*gltA*) gene, partial cds.

ACCESSION GQ404430

VERSION GQ404430.1 GI:257136319

KEYWORDS .

SOURCE Candidatus Rickettsia rioja

 ORGANISM [Candidatus Rickettsia rioja](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; Rickettsieae; Rickettsia; spotted fever group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 800)

 AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.

 TITLE Candidatus Rickettsia rioja from Spain

 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 800)

 AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.

 TITLE Direct Submission

 JOURNAL Submitted (22-JUL-2009) Area of Infectious Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR, C/ Piqueras,98, Logrono,La Rioja 26006, Spain

FEATURES Location/Qualifiers

 source 1..800
 /organism="Candidatus Rickettsia rioja"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="DER-204-1"
 /isolation_source="engorged female tick attached to a male DEBONEL patient"
 /host="Dermacentor marginatus Der-204"
 /db_xref="taxon:[409324](#)"
 /country="Spain: Aguilar del Rio Alhama, La Rioja"
 /collection_date="27-Oct-2005"

 gene <1..>800
 /gene="gltA"

 CDS <1..>800
 /gene="gltA"
 /codon_start=2
 /transl_table=[11](#)

```
/product="citrate synthase"  
/protein_id="ACV44460.1"  
/db_xref="GI:257136320"
```

```
/translation="DISRVSAEADCFTYDPGFMSTASCQSTITYIDGDKGILRHRGYDIKDIAEKSEFLEVAY  
LLIYGELPSGEQYNNFTKQVAHHSLVNERLHYLFQTFCSSSHPMAIMLAAVGSLSAFYDLLNFKEADYELIA  
IRMIAEIPTIAAMSYKYSIGQFFIYPDNSLDFTENFLHMMFATPCTKYKVNPIKKNALNKIFILHADHEQNAS  
TSTVRIAGSSGANPFACISTGIASLWGPAGGGANEAVINMLKEIGSSEYIPKYIAKAKVKC"
```

ORIGIN

```
1 cgatataagt agggatatctg cggaagccga ttgctttact tacgaccg gttttatgct  
61 tactgcttct tgtcagtcta ctatcaccta tatagacggt gataaaggaa tcttgcgga  
121 togaggatat gatattaaag acatagctga gaaaagttaa tttttagaag tggcatat  
181 actgatttat ggggaactac caagtgggta gcagtataat aatttacta aacaggttg  
241 tcatcattca ttagtgaatg aaagattaca ctatttattt caaacctttt gtagctctt  
301 tcatcctatg gctattatgc ttgcggtgt cggttctctt tcggcatttt atcctgatt  
361 attgaatttt aaggaagcag attacgaact tatcgctatt agaatgattg ctgagatacc  
421 taccatcgcc gcaatgtctt ataaatattc tataggacaa cggtttattt atcctgataa  
481 ttogttagat tttaccgaaa attttctgca tatgatggtt gcaacgcctt gtacgaaata  
541 taaagtaaat ccaataataa aaaatgctct taataagata tttatcctac atgccgatca  
601 tgagcagaat gcttctactt caacagtccg aattgccggc tcatccggag ctaaccctt  
661 tgcttgatt agcacgggta ttgcctcact ttggggacct gctcacggcg gggctaata  
721 agcggtaata aatatgctta aagaaatcgg tagttctgag tatattccta aatatatagc  
781 taaagctaag gtaaaatgcc
```

4.5. Secuencia nucleotídica de *Candidatus R. rioja* (gen *ompB*)

Candidatus Rickettsia rioja isolate DER-204-1 outer membrane protein B (*ompB*) gene, partial cds

GenBank: GQ404431.1

LOCUS GQ404431 463 bp DNA linear BCT 08-SEP-2009
 DEFINITION Candidatus Rickettsia rioja isolate DER-204-1 outer membrane protein B (*ompB*) gene, partial cds.
 ACCESSION GQ404431
 VERSION GQ404431.1 GI:257136321
 KEYWORDS .
 SOURCE Candidatus Rickettsia rioja
 ORGANISM [Candidatus Rickettsia rioja](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; Rickettsieae; Rickettsia; spotted fever group.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 463)
 AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.
 TITLE Candidatus Rickettsia rioja from Spain
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 463)
 AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (22-JUL-2009) Area of Infectious Diseases,Hospital San Pedro-CIBIR, C/Piqueras,98, Logrono,La Rioja 26006, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..463
 /organism="Candidatus Rickettsia rioja"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="DER-204-1"
 /isolation_source="engorged female tick attached to a male DEBONEL patient"
 /host="Dermacentor marginatus Der-204"
 /db_xref="taxon:[409324](#)"
 /country="Spain: Aguilar del Rio Alhama, La Rioja"
 /collection_date="27-Oct-2005"
 gene <1..>463
 /gene="ompB"
 CDS <1..>463
 /gene="ompB"
 /note="OmpB"
 /codon_start=3

```
/transl_table=11  
/product="outer membrane protein B"  
/protein_id="ACV44461.1"  
/db_xref="GI:257136322"
```

```
/translation="YGLLRANQDYVITRTNNAENVVTNDIANSLFGGAPGVGQNVTTFVNATNTAAYNNLLL  
AKNSAAAANFVGAIVTDTSAAVTNAQLDVAKDIQAQLGNRLGALRYLGTPETAEMAGPEVGAIPAAVAAGDEA  
VDNVAYGIWPNLSILMHIKVR"
```

ORIGIN

```
1  attacggttt attacgtgct gctaaccaag attatgtaat aacacgtact aacaatgcag  
61  aaaacgtagt tactaatgat atcgcaaata gtctgtttgg aggtgcacca ggtgtaggtc  
121 agaacgttac aacatttgta aatgcaacta atactgcagc atataataat cttcttttag  
181 ctaaaaatag tgctgctgct gtaactttg tcggagctat cgttaccgat acaagtgcgg  
241 ccgtaactaa tgcacaatta gatgtagcta aagatatcca agctcaactt ggtaacagat  
301 taggtgctct tagatattta ggtactcctg aaactgctga aatggctgga cctgaagttg  
361 gagcaatacc ggctgcggtt gctgcagggt acgaggctgt tgataatgta gcttacggtg  
421 tatggccaaa cctttctata ctgatgcaca tcaaagtaag aaa
```

4.6. Secuencia nucleotídica de *Candidatus R. rioja* (gen *ompA*)

Candidatus Rickettsia rioja isolate DER-204-1 outer membrane protein A (*ompA*) gene, partial cds

GenBank: GQ404429.1

LOCUS GQ404429 488 bp DNA linear BCT 08-SEP-2009
 DEFINITION Candidatus Rickettsia rioja isolate DER-204-1 outer membrane protein A (*ompA*) gene, partial cds.
 ACCESSION GQ404429
 VERSION GQ404429.1 GI:257136317
 KEYWORDS .
 SOURCE Candidatus Rickettsia rioja
 ORGANISM [Candidatus Rickettsia rioja](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; Rickettsieae; Rickettsia; spotted fever group.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 488)
 AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.
 TITLE Candidatus Rickettsia rioja from Spain
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 488)
 AUTHORS Portillo,A., Ibarra,V., Santibanez,S., Santibanez,P., Perez-Martinez,L., Blanco,J.R. and Oteo,J.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (22-JUL-2009) Area of Infectious Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR, C/ Piqueras, 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..488
 /organism="Candidatus Rickettsia rioja"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="DER-204-1"
 /isolation_source="engorged female tick attached to a male DEBONEL patient"
 /host="Dermacentor marginatus Der-204"
 /db_xref="taxon:409324"
 /country="Spain: Aguilar del Rio Alhama, La Rioja"
 /collection_date="27-Oct-2005"
 gene <1..>488
 /gene="ompA"
 CDS <1..>488
 /gene="ompA"
 /note="OmpA"
 /codon_start=1

```
/transl_table=11
/product="outer membrane protein A"
/protein_id="ACV44459.1"
/db_xref="GI:257136318"
```

```
/translation="LFQKAIQQGLKAALFTTLTAAIMLSSSGALGVAAGVISTNNAAFNDLAIANNWNEITAR
GVANGTPAGGPQDNGAFTYCGDHTITADEAGRIITAINVAGTTPVGLNITQNTVVGSIVTGGNLLPFTITASK
SLTLNGTNAVAANHGFADAPADNYTGLGNIT"
```

ORIGIN

```
1 ttatttcaaa aagcaatata acaaggtcct aaagccgctt tattcaccac cttaaccgca
61 gcgataatgc tgagtagtag cggggcactc ggtggtgctg cagggtgtat ttctactaat
121 aatgcagcat ttaatgatct tgctattgcc aataattgga atgagataac ggctagaggg
181 gtagctaata gtagctcctc tgggtggtcct caagacaatg gggcatttac ttactgtggt
241 gatcactacta tcaactgcaga tgaagcgggt cgtattatta cggctataaa tgtggcgggt
301 actactcccg taggtctaaa tattactcaa aataccgtag ttggttcgat tgtgacggga
361 ggtaacttgt tgccttttac tattactgcc agcaaaagct taactttaa cggctactaat
421 gctggttgctg caaatcatgg ttttgatgct cctgccgata attatacagg tttaggaaat
481 ataacttt
```

En el anexo se muestran las alineaciones de las distintas secuencias de *Rickettsia* spp. amplificadas con cada uno de los genes mediante el programa Clustalw.

DISCUSIÓN

En los últimos años, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha aportado un gran avance en el diagnóstico de las rickettsiosis. Así, la reacción de PCR y la posterior secuenciación de los fragmentos genéticos amplificados constituyen en la actualidad una herramienta muy útil para la detección y posterior identificación de *Rickettsia* spp. en muestras clínicas y artrópodos. Este hecho ha permitido el descubrimiento de nuevas especies de rickettsia y su implicación en patología humana. Entre las dianas de PCR utilizadas para el diagnóstico de las infecciones por *Rickettsia* spp. se encuentran el gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal, y los genes que codifican las proteínas citrato sintasa (GltA), rOmpA, rOmpB y una proteína antigénica de 17kDa (gen *htrA*). Estos genes están ampliamente estudiados y, aunque han sido utilizadas por diferentes autores para el diagnóstico molecular de las rickettsiosis, no se conocía realmente cuál era su sensibilidad y su validez para identificar especies de rickettsia en nuestro medio.

En este trabajo hemos encontrado que la combinación de tres reacciones de PCR secuenciales (genes *ompB*, *ompA* y *gltA*) permiten la detección de rickettsia en el 100% de las muestras estudiadas. Estas reacciones de PCR se han utilizado tanto para el diagnóstico molecular de las rickettsiosis (Choi *et al.*, 2005b; Leitner *et al.*, 2002), como para implicar nuevas especies de rickettsia en diferentes cuadros clínicos, como son la implicación a nivel mundial de *R. monacensis* como patógeno humano o los primeros casos publicados en España, de *R. felis* y *R. sibirica* subsp. *mongolitimona* (Jado *et al.*, 2007; Oteo *et al.*, 2006b; Aguirrebengoa *et al.*, 2008). Estas reacciones de PCR secuenciales han permitido también la caracterización genética de una nueva rickettsia (*Candidatus R. rioja*), implicada en patología humana (Portillo *et al.*, 2009).

De las reacciones de PCR simples utilizadas en este trabajo, la que utiliza como diana el extremo 5' del gen *gltA*, ha sido la que ha ofrecido mejores resultados de sensibilidad, ya que permitió detectar, en un solo ensayo, *Rickettsia* spp. en el 33,3% de las muestras analizadas. Esta reacción de PCR (Labruna *et al.*, 2004) se diseñó para detectar la presencia de *R. rickettsii* en garrapatas *Amblyomma cooperi* en Brasil. Los autores utilizaron esa diana para detectar rickettsia en garrapatas en las que ya habían constatado su infección mediante una reacción de

PCR a tiempo real, usando también como diana, un fragmento del gen *gltA*. En este caso la sensibilidad alcanzada fue del 84,2%, dato similar al que obtuvimos nosotros con esta misma diana en los artrópodos procesados (85,1%). Además, gracias a estos cebadores hemos conseguido amplificar *Rickettsia* spp. a partir de muestras humanas utilizando una reacción de PCR simple. Spolidorio *et al.*, también amplificaron *R. rickettsii* en una biopsia de un paciente con sospecha de rickettsiosis mediante este ensayo de PCR simple (Spolidorio *et al.*, 2010) y recientemente, utilizando estos mismos cebadores, se ha amplificado *R. parkeri* en dos pacientes en Argentina (Romer *et al.*, 2011).

Los datos de sensibilidad obtenidos con el resto de las reacciones de PCR simples [11,1% (región central *gltA*); 13,8% (*ompA* y *htrA*); 18% (gen ARNr 16S) y 23,6% (*ompB*)], ponen de manifiesto el bajo rendimiento de estas dianas para el diagnóstico molecular de las rickettsiosis.

La comparación de las secuencias del gen que codifica el ARN ribosomal constituye una valiosa herramienta para estudiar la filogenia y las diferencias evolutivas existentes entre las especies bacterianas. Este gen, presente en todas las especies bacterianas y por lo tanto en todas las especies de rickettsia, parece ser *a priori* una diana sensible para la detección de rickettsia en muestras clínicas. Se han diseñado numerosas parejas de cebadores para amplificar este gen; algunas detectan la mayoría de eubacterias y otras, más específicas para determinados grupos de bacterias (Weisburg *et al.*, 1991). El cebador directo utilizado en nuestro trabajo para amplificar un fragmento del gen ARNr 16S fue diseñado para el grupo de las proteobacterias, entre las que se encuentra el género rickettsia. El cebador inverso fue diseñado por Márquez y cols. en 1998 a partir de la secuencia del gen ARNr 16S de *R. canada* y se presenta como específico de *Rickettsia* GFM. Hemos encontrado en la literatura diferentes artículos en los que amplifican fragmentos de este gen para comparar y establecer las diferencias filogenéticas entre especies, y sobre todo para caracterizar genéticamente nuevas especies de rickettsia (Sekeyova *et al.*, 1998; Stenos *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 2006a; Mediannikov *et al.*, 2008), pero son muy pocos los trabajos en los que se utiliza este método de PCR para el diagnóstico molecular de las rickettsiosis (Fournier *et al.*, 2000a; Fournier *et al.*, 2003b). El mismo fragmento utilizado por nosotros en

este trabajo fue empleado por Simser y cols. en 2002. Dichos autores amplificaron *R. monacensis* en *I. ricinus* y, gracias al análisis del fragmento amplificado del gen ARNr 16S, establecieron las diferencias filogenéticas de ésta, con otras especies de rickettsia (Simser *et al.*, 2002). Tanto en el trabajo llevado a cabo por Simser como en el trabajo en el que se diseñó el cebador inverso utilizado en esta reacción de PCR (Márquez *et al.*, 1998), la especie amplificada fue *R. monacensis*. En el trabajo que se presenta en esta memoria no se ha detectado *R. monacensis* en ninguna de las muestras procesadas, si bien, entre los artrópodos de este trabajo no se encontraba ningún espécimen de *I. ricinus* (garrapata asociada a esta especie de rickettsia). Además, hay que tener en cuenta que *R. monacensis* sólo ha sido amplificada una vez a partir de muestras humanas (por nuestro grupo), en un aislamiento de cultivo celular (Jado *et al.*, 2007). Utilizando este mismo fragmento del gen ARNr 16S como diana de PCR nosotros detectamos *Rickettsia* spp. en garrapatas recogidas sobre la vegetación y de animales (Ibarra, 2007). En la literatura también encontramos varios trabajos en los que han amplificado diferentes especies de *Rickettsia* en garrapatas utilizando esta diana de PCR (Floris *et al.*, 2008; Sprong *et al.*, 2009; Tijssse-Klasen *et al.*, 2011). En el artículo de Weisburg y cols., se describen unos cebadores universales que amplifican un fragmento de 1500 pb, prácticamente la secuencia completa del gen ARNr 16S (Weisburg *et al.*, 1991). Esta PCR, que permite amplificar una gran diversidad de bacterias se puede utilizar como un cribado para el diagnóstico de diversas infecciones. En 2008 se detectó *R. conorii* en muestras de bazo y biopsia de piel de un paciente mediante este método de PCR. Estos datos fueron confirmados llevando a cabo posteriormente reacciones de PCR de los genes *gltA* y *ompA* (Schmulewitz *et al.*, 2008). En nuestra experiencia hemos amplificado ADN de *Brucella* sp. y *Enterococcus faecalis* en muestras humanas (datos no publicados), pero no *Rickettsia* spp.

La secuencia de los cebadores que amplifican el fragmento de 381 pb de la región central del gen que codifica la citrato sintasa fueron diseñados por Regnery y cols. en 1991 (Regnery *et al.*, 1991) a partir de la secuencia del gen *gltA* de *R. prowazekii*. Utilizando esta diana de PCR tan sólo conseguimos amplificar *Rickettsia* spp. en el 11,1% de las muestras procesadas, el porcentaje de

sensibilidad más bajo obtenido en este trabajo. Todas las muestras eran, además, artrópodos retirados de pacientes. Existen diversos trabajos en los que se ha amplificado rickettsia a partir de artrópodos mediante una PCR simple del gen *gltA* (Inokuma *et al.*, 2007; Sarih *et al.*, 2008; Chmielewski *et al.*, 2009; Stańczak *et al.*, 2009; Dib *et al.*, 2009; Bitam *et al.*, 2009; Shpynov *et al.*, 2009). Aunque nosotros no hemos amplificado *Rickettsia* spp. a partir de muestras humanas (fluidos biológicos o biopsias), mediante esta reacción de PCR simple de la región central del gen *gltA*, sí se ha descrito en la literatura la amplificación de *Rickettsia* spp. utilizando estos mismos cebadores en muestras de sangre (Zavala-Castro *et al.*, 2009; Tabara *et al.*, 2011).

El gen *ompA* ha sido ampliamente utilizado como diana de PCR para el diagnóstico molecular de las rickettsiosis. El cebador directo utilizado en este ensayo de PCR (Rr 190.70) fue diseñado por Regnery y cols. en 1991 (Regnery *et al.*, 1991). Cinco años más tarde, Roux y cols. diseñaron un método de amplificación por PCR seguido de análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción, para diferenciar especies de *Rickettsia* GFM (Roux *et al.*, 1996). Para llevar a cabo este trabajo emplearon el cebador Rr 190.70 (Regnery *et al.*, 1991) y el cebador Rr190.701, obteniendo así un fragmento de amplificación de 631 pb del gen *ompA*. Mediante esta diana de PCR se ha amplificado *Rickettsia* spp. tanto en muestras de sangre y biopsias humanas, como en garrapatas retiradas de pacientes (Fournier *et al.*, 2000a, Fournier *et al.*, 2005; Psaurolaki *et al.*, 2005; Gaywee *et al.*, 2007; Caron *et al.*, 2008; Méchaï *et al.*, 2009; Bitam *et al.*, 2009; Papa *et al.*, 2010; Socolovschi *et al.*, 2010b) y también se ha utilizado, con muy buenos resultados para amplificar rickettsia en garrapatas recogidas sobre animales y vegetación (Shpynov *et al.*, 2009).

Los cebadores que amplifican el fragmento del gen *htrA* que hemos utilizado como diana en nuestro trabajo, fueron diseñados por Webb y cols. (Webb *et al.*, 1990). Las condiciones de esta reacción de PCR fueron modificadas posteriormente (Oliveira *et al.*, 2002). Estas condiciones optimizadas han sido las que hemos empleado en este trabajo. El porcentaje de sensibilidad que obtuvimos mediante esta diana (13,8%) fue el mismo obtenido al emplear la PCR simple del gen *ompA*. Sin embargo, mediante la PCR de *ompA* conseguimos amplificar

Rickettsia spp. en una biopsia cutánea y mediante la diana que emplea el fragmento del gen *htrA* no conseguimos amplificar *Rickettsia* spp. en ningún fluido biológico ni en ninguna de las biopsias procesadas. En la literatura consultada hemos encontrado publicaciones en las que describen amplificaciones de *Rickettsia* spp. en muestras de sangre mediante una reacción de PCR simple del gen *htrA* (Zavala-Castro *et al.*, 2008; Tabara *et al.*, 2011).

En este trabajo se ha valorado como método de PCR simple del gen *ompB*, una reacción que amplifica un fragmento de 511 pb. Los cebadores utilizados para llevar a cabo este método de PCR simple, fueron diseñados a partir del genoma de *R. conorii* (Choi *et al.*, 2005a). Mediante este método de PCR detectamos *Rickettsia* spp. en el 23,6% de las muestras procesadas.

En cuanto a las reacciones de PCR secuenciales, aquella que utiliza como diana un fragmento de 420 pb del gen *ompB*, específico de *Rickettsia* GFM (Choi *et al.*, 2005a), permitió detectar *Rickettsia* spp. en el 83,3 % de las muestras. Los autores llevaron a cabo estas reacciones de PCR en 200 muestras de suero de pacientes con síndrome febril, y títulos de IgM positivos frente a diferentes especies de rickettsia, consiguiendo amplificar bandas del tamaño esperado en 24 pacientes (12%). La sensibilidad lograda en el trabajo de Choi y cols. es considerablemente inferior a la obtenida por nosotros, que hemos logrado detectar *Rickettsia* spp. en el 62,5% de los sueros analizados. Mediante esta reacción de PCR anidada, conseguimos detectar *Rickettsia* spp. en muestras de sangre completa con EDTA, plasma, capa leucocitaria, capa eritrocitaria, suero y artrópodos.

En la literatura también hemos encontrado varios trabajos en los que amplifican ADN de *Rickettsia* spp. a partir de muestras humanas mediante esta reacción de PCR anidada (Oteo *et al.*, 2006b; Aguirrebengoa *et al.*, 2008; Nilsson, 2009; Lindblom *et al.*, 2010; García-García *et al.*, 2010).

Así como mediante la reacción de PCR simple de la región central del gen *gltA* sólo conseguimos detectar *Rickettsia* spp. en los artrópodos retirados de los pacientes, al llevar a cabo la reacción de PCR anidada, logramos detectar *Rickettsia* spp. en todas las muestras clínicas, a excepción de las muestras de la

capa leucocitaria. Los cebadores que se emplearon para amplificar el fragmento interno de 337 pb fueron diseñados para confirmar la presencia de *Rickettsia* GFM y del GT en pacientes con sospecha de rickettsiosis en los cuales ya se había detectado la presencia de rickettsia utilizando una reacción de PCR anidada del gen *ompB* (Choi *et al.*, 2005a). Esta reacción de PCR anidada del gen *gltA* ha contribuido al diagnóstico molecular de rickettsiosis en diferentes publicaciones (Oteo *et al.*, 2006b; Aguirrebengoa *et al.*, 2008; García-García *et al.*, 2010; Ibarra *et al.*, 2012).

La reacción de PCR semianidada del gen *ompA* utilizada en este trabajo (Oteo *et al.*, 2004b), surgió de la combinación de la reacción de PCR descrita por Roux y cols. en 1996 y la que previamente había diseñado Regnery y cols. en 1991. (Regnery *et al.*, 1991; Roux *et al.*, 1996). El fragmento amplificado en esta reacción de PCR es de 532 pb, 100 pb menos que el fragmento original. Gracias a este método de PCR, se ha podido detectar *Rickettsia* spp. en el 48,6 % de las muestras procesadas. No obstante es el resultado de sensibilidad más bajo obtenido de las tres reacciones de PCR secuenciales empleadas en el trabajo que se presenta en esta memoria.

En este trabajo no hemos utilizado una reacción de PCR anidada del gen *htrA*, si bien, hemos encontrado en la literatura varios casos en los que sí utilizan una reacción de PCR anidada del gen *htrA* para la detección de *Rickettsia* spp. en muestras clínicas. Así, en 2007, se amplificó *R. japonica* (Gaywee *et al.*, 2007). En 2009, se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en el 40% de sueros correspondientes a pacientes con casos fatales de rickettsiosis, la sensibilidad se reducía al 8% si sólo llevaban a cabo la primera reacción de PCR (Mendes do Nascimento *et al.*, 2009). También, mediante una reacción de PCR anidada del gen *htrA* se detectó *R. helvetica* en la muestra de suero de un paciente (Nilsson, 2009) y, mediante una reacción de PCR semianidada se amplificó ADN de este mismo patógeno en un ganglio linfático y en una arteria coronaria de dos pacientes con perimicarditis crónica (Nilsson *et al.*, 1999). Llevando a cabo una reacción de PCR anidada dentro del mismo fragmento, que nosotros hemos valorado como diana de PCR en este trabajo, se ha conseguido detectar *Rickettsia*

sp. en artrópodos en los que no se pudo amplificar *Rickettsia* sp. en la primera reacción de PCR (Oliveira *et al.*, 2008).

Como muestran los resultados obtenidos en esta memoria, la realización de reacciones de PCR secuenciales aumenta considerablemente la sensibilidad. En nuestro trabajo hemos mejorado el rendimiento de las reacciones de PCR hasta el 48,6% para la reacción de PCR semianidada del gen *ompA*, el 58,3 % para la PCR que utiliza como diana el fragmento de 337 pb de la región central del gen *gltA* y el 83,3% para la reacción de PCR anidada del gen *ompB*. Si bien la utilización de reacciones de PCR secuenciales está ampliamente extendida dado su aumento de eficacia, es también conocido el riesgo de contaminación que lleva consigo, al utilizar producto amplificado como diana de PCR para la segunda amplificación. En nuestra experiencia no hemos constatado contaminación alguna. En nuestro laboratorio siempre utilizamos zonas independientes para la extracción del ADN, así como para la primera y segunda reacción de amplificación. Además empleamos siempre controles negativos, y secuenciamos todas las bandas obtenidas del tamaño esperado.

En los últimos años han sido varios los trabajos publicados en los que han empleado reacciones de PCR a tiempo real (o PCR cuantitativa), como método diagnóstico de rickettsiosis (Whitman *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2010; Socolovschi *et al.*, 2010a; Ben-Zvi *et al.*, 2010). Recientemente, Renvoisé y cols. han publicado un trabajo en el que detallan el uso de la PCR cuantitativa en el diagnóstico molecular de rickettsiosis. En este artículo utilizan la PCR a tiempo real para detectar *Rickettsia* spp. en 509 muestras clínicas recibidas en el Centro Nacional de Referencia Francés para el diagnóstico de estas infecciones. Para llevar a cabo este trabajo desarrollaron diferentes sondas y cebadores como resultado de la comparación de las distintas secuencias genómicas disponibles. Así, amplificaron *Rickettsia* spp. en 45 de las muestras procesadas (8,84%). En 37 de estas muestras se consiguió llegar a la identificación a nivel de especie, en 3 de ellas utilizando una PCR convencional, con los genes *ompA*, *ompB* y *gltA*. Cabe destacar que tanto los cebadores usados para amplificar el fragmento del gen *ompA* como los del gen *gltA* son los mismos utilizados en nuestro trabajo. No se consiguió llegar a la identificación a nivel de

especie en 8 muestras (Renvoisé *et al.*, 2012). Angelakis y cols. también en 2012 emplearon una PCR a tiempo real para el diagnóstico de rickettsiosis. Procesaron 145 biopsias cutáneas y 95 garrapatas retiradas de pacientes con sospecha de rickettsiosis. Estos autores realizaron un primer cribado mediante PCR cuantitativa, y las muestras positivas fueron posteriormente procesadas mediante PCR convencional. Para llevar a cabo la PCR convencional emplearon cebadores que amplificaron un fragmento del gen *gltA* y del gen *ompA*, este último fue el mismo fragmento utilizado por nosotros en el trabajo que se presenta en esta memoria. Mediante PCR cuantitativa detectaron *Rickettsia* spp. en el 28,2% de las biopsias, y en el 25% de las garrapatas procesadas (Angelakis *et al.*, 2012).

En referencia a la especificidad, nuestros resultados no nos ofrecen dudas. Así como el fragmento del gen *ompB* es la diana más sensible para la detección de rickettsia en muestras clínicas, es también la menos específica. La región que se amplifica en esta reacción de PCR es una región altamente conservada. Los mismos autores que diseñaron los cebadores que amplifican este fragmento, ya apuntaron en su trabajo la baja especificidad de esta reacción de PCR. De hecho, en el mismo trabajo diseñaron unos cebadores para llevar a cabo una reacción de PCR anidada del gen *gltA*, que utilizaron para confirmar los resultados positivos obtenidos por esta reacción de PCR del gen *ompB* (Choi *et al.*, 2005a). Posteriormente estos mismos autores diseñaron una nueva reacción de PCR anidada también utilizando como diana el gen *ompB*. El fragmento amplificado esta vez era de 267 pb, aún más pequeño que el anterior, y como sucede con el anterior ensayo de PCR, éste también reveló problemas de falta de especificidad, ya que no permitió diferenciar entre determinadas especies de *Rickettsia* GFM (Choi *et al.*, 2005b).

Aunque el artículo de Choi y cols. ha sido puesto en entredicho por varios autores (Fournier *et al.*, 2006b; Ma, 2006), esta reacción de PCR ha sido utilizada para detectar *Rickettsia* spp. en muestras humanas. Así, Lindblom y cols. amplificaron ADN de *R. felis* a partir de líquido cefalorraquídeo de dos pacientes. Los resultados se confirmaron posteriormente empleando una reacción de PCR anidada del gen *htrA* (Lindblom *et al.*, 2010).

El fragmento del gen *ompA* que hemos utilizado como diana de PCR en el trabajo que se presenta en esta memoria fue diseñado, como ya hemos mencionado anteriormente, por Regnery y cols., y Roux y cols. (Regnery *et al.*, 1991; Roux *et al.*, 1996). Roux y cols. consiguieron amplificar este fragmento de 632 pb en 10 de las 14 especies de *Rickettsia* GFM que había validadas en ese momento. El fragmento fue detectado en: *R. conorii*, *R. rickettsii*, *R. rhipicephali*, *R. montana*, *R. japonica*, *R. parkerii*, *R. africae*, *R. massiliae*, *R. sibirica* y *R. felis*. Únicamente no pudo ser amplificado en *R. akari*, *R. australis*, *R. helvetica* y *R. bellii*.

La proteína rOmpA está expuesta en la superficie de las rickettsias, lo que le hace ser más susceptible a sufrir la presión evolutiva. Este hecho se manifiesta con un aumento de la variabilidad entre las distintas especies (Regnery *et al.*, 1991). Esta variabilidad inter especies existente entre las rickettsias GFM en el gen *ompA*, es superior que la variabilidad existente en los genes ARN 16S y *gltA*, hecho que fue corroborado más tarde por Fournier y cols. Estos autores obtuvieron la secuencia completa (excepto una parte de la región central) del gen *ompA* de 21 aislamientos de *Rickettsia* spp. y comprobaron lo ya apuntado por Regnery y cols. en 1991 (Fournier *et al.*, 1998a).

Este hecho coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que, al llevar a cabo los alineamientos de los diferentes fragmentos genéticos amplificados, encontramos que en el caso del gen *ompA* existían un mayor número de cambios nucleotídicos entre las diferentes especies de rickettsia que en los alineamientos genéticos del resto de los genes (anexo 1). Además, en nuestra experiencia, este fragmento del gen *ompA* es la diana que mejor se correlaciona con el diagnóstico clínico. Hecho que se constató al analizar los resultados obtenidos y, teniendo en cuenta los máximos porcentajes de identidad que reveló el análisis de las secuencias nucleotídicas amplificadas en las diferentes muestras, y el síndrome clínico que tenían los pacientes. Así, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas, tanto en las muestras de sangre con EDTA, como en los *D. marginatus* de los pacientes con DEBONEL/TIBOLA, mostró una elevada similitud (99,8%) con *Candidatus R. rioja* (en el caso de las muestras de sangre), y con *Candidatus R. rioja* (99,4-100 %), *R. raoultii* (100%) o *R. slovacica* (98,9-

100%) en las garrapatas. Estas *Rickettsia* spp. con las cuales las secuencias nucleotídicas amplificadas mediante el método de PCR del gen *ompA* muestran elevados porcentajes de identidad, coinciden con las *Rickettsia* spp. implicadas en los casos de DEBONEL/TIBOLA. *R. slovacca* fue aislada de la biopsia de piel de un paciente con DEBONEL/TIBOLA en 2002 (Cazorla *et al.*, 2003) y desde entonces esta *Rickettsia* GFM ha sido considerada el agente etiológico de la enfermedad. No obstante, nuestro grupo ya había apuntado la posibilidad de que otras *Rickettsia* spp. pudieran ser los causantes de algunos de los casos de DEBONEL/TIBOLA en nuestra región (Oteo *et al.*, 2004a). Así, *Candidatus* *R. rioja* ha sido detectada en garrapatas y en muestras de sangre de 2 pacientes con DEBONEL/TIBOLA (Ibarra *et al.*, 2005; Portillo *et al.*, 2009), y *R. raoultii* en garrapatas retiradas de pacientes que han desarrollado esta infección (Parola *et al.*, 2009). En cambio, al utilizar como diana de PCR el fragmento del gen *ompB* en los pacientes con DEBONEL/TIBOLA, encontramos, a partir de la muestra de eritrocitos en 3 de ellos, máxima similitud con *R. conorii* (99,0-99,7%). El hecho de que la secuencia nucleotídica amplificada mediante el método de PCR del gen *ompB* a partir de las muestras de sangre de los pacientes con DEBONEL/TIBOLA, muestre una elevada similitud con *R. conorii* podría explicarse ya que la región que hemos amplificado de este gen, está altamente conservada y sólo presenta 7 cambios nucleotídicos entre *R. conorii* y *Candidatus* *R. rioja*, y dos mutaciones puntuales entre *R. conorii* y *R. slovacca*. Por último, *Candidatus* *R. rioja* y *R. raoultii* son indistinguibles usando este fragmento.

Algo similar sucedió cuando usamos la PCR que utiliza como diana la región central del gen *gltA*. En la muestra de sangre de un paciente con DEBONEL/TIBOLA, la especie de rickettsia con la cual la secuencia nucleotídica amplificada mostró mayor similitud, fue *R. felis*. En esta misma muestra, el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida mediante el método de PCR del gen *ompA*, mostró máxima identidad con *Candidatus* *R. rioja*. En 6 garrapatas, la especie de rickettsia con la cual la secuencia nucleotídica amplificada mediante el método de PCR del gen *gltA*, mostró una mayor identidad (99,4%) fue *Rickettsia* sp. DmS1. Esta rickettsia que, hasta la fecha, no ha sido cultivada (Sanogo *et al.*, 2003), ha sido detectada en *D. marginatus* retirados de pacientes que han

desarrollado DEBONEL/TIBOLA (datos no publicados), y queda por demostrar su posible papel en esta infección. En estas muestras de acuerdo a las secuencias nucleotídicas del GenBank, el fragmento amplificado del gen *ompA* muestra una identidad del 100% con *Candidatus R. rioja*.

Regnery y cols. en el trabajo que llevaron a cabo en 1991 ya apuntaron que no podía usarse el fragmento amplificado del gen *gltA* para distinguir entre diversas especies con genotipos cercanos como *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. conorii* y *R. montana*, pero que estas mismas especies si podían diferenciarse mediante el gen *ompA*. De hecho, el trabajo de Regnery y cols. puso de manifiesto que el gen que codifica la proteína de 190kDa (*ompA*) tiene una mayor variabilidad genética inter especies, que el gen que codifica la citrato sintasa. Por ello, entre las rickettsias GFM existe una divergencia en las secuencias nucleotídicas menor del 2,3% para el gen *gltA*, mientras que en el caso del gen *ompA*, es menor del 3,2% (Regnery *et al.*, 1991). Este hecho se ha constatado por otros autores y en algunos casos, la secuencia amplificada utilizando como diana el gen *gltA* no permite distinguir entre 2 especies de rickettsia, necesitando utilizar otra diana de PCR para establecer ante qué especie de *Rickettsia* nos encontramos (Sashika *et al.*, 2010). Hemos encontrado varios trabajos en los que, tras utilizar como diana el gen *gltA* (primer cribado) utilizan una segunda reacción de PCR confirmatoria, utilizando esta vez como diana, los cebadores del gen *ompA* (Sarih *et al.*, 2008; Mura *et al.*, 2008; Selmi *et al.*, 2008; Bitam *et al.*, 2009; Shpynov *et al.*, 2009; Pluta *et al.*, 2009; Chmielewski *et al.*, 2009; Dib *et al.*, 2009). También hemos encontrado artículos en los que utilizan una reacción de PCR del gen *htrA* para confirmar los resultados positivos obtenidos con la reacción de PCR del gen *gltA* (Jilintai *et al.*, 2008; Inokuma *et al.*, 2008).

El gen *ompA* es también la diana más específica para llevar a cabo el diagnóstico de FB. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante este método de PCR mostraron una correlación del 100% con el cuadro clínico. Dato que no ocurre con el método de PCR que utiliza como diana el gen *ompB*. La especificidad también es baja cuando utilizamos la PCR anidada del gen *gltA* en estos pacientes. En nuestro trabajo, al analizar las secuencias nucleotídicas amplificadas en las muestras de sangre y en garrapatas de pacientes con FB,

encontramos una alta identidad con *R. conorii*. Sin embargo, el análisis nucleotídico también reveló elevadas similitudes con otras *Rickettsia* spp., que difícilmente pueden ser las responsables de la infección (*R. felis*, *R. slovaca* y *R. honei* subsp. *marmioni*). Estos cebadores que amplifican el fragmento dentro del gen *gltA* se diseñaron a partir de la secuencia de *R. prowazekii* y se han utilizado para amplificar *R. felis* en muestras de suero de pacientes con rickettsiosis (Choi *et al.*, 2005b). Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros resultados, el diagnóstico de infección por *R. felis* no debe estar basado sólo en la amplificación mediante esta diana, ya que, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de las muestras de un paciente con DEBONEL/TIBOLA y dos con FB, mostró alta identidad con esta especie de rickettsia.

Nuestro trabajo también ha puesto de manifiesto una gran falta de especificidad para detectar *Rickettsia* spp. en *D. marginatus* utilizando como diana de PCR el gen *htrA*. Los porcentajes más altos de identidad obtenidos (99,5-100%) usando estos cebadores corresponden a *R. peacockii*, *R. parkerii* y *R. rickettsii*. Estas *Rickettsia* spp. no están presentes en nuestro medio y nunca han sido implicadas en casos de DEBONEL/TIBOLA. En estas garrapatas, el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el método de PCR del gen *ompA*, mostró una elevada identidad con *R. slovaca*. Además de esta falta de especificidad del gen *htrA*, también observamos una gran falta de sensibilidad, ya que mediante esta diana de PCR no se pudo amplificar ninguna *Rickettsia* spp. en las garrapatas en las que habíamos obtenido una elevada identidad con *Candidatus R. rioja* o *R. raoultii* al analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas con los métodos de PCR de los genes *ompA*, *ompB* y *gltA*. Chmielewski y cols. en 2009 publicaron una observación similar. En ese trabajo detectaron *R. raoultii* en *Dermacentor reticulatus* recogidos de vegetación utilizando como diana de PCR los genes *gltA* y *ompA*, pero no fueron capaces de amplificar esta rickettsia utilizando los cebadores del gen *htrA* (Chmielewski *et al.*, 2009).

Al llevar a cabo las reacciones de PCR utilizando como diana el gen ARNr 16S hemos encontrado el mismo problema de especificidad. Al analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas con este método de PCR, obtuvimos una elevada identidad con *R. peacockii* y *R. rickettsii*. Sin embargo el análisis de las

secuencias nucleotídicas obtenidas mediante el método de PCR del gen *ompA* mostró máxima identidad con *R. slovacica*. En una garrapata de un paciente con DEBONEL/TIBOLA, la secuencia amplificada del gen ARNr 16S mostró una identidad del 100% con una bacteria no cultivada “uncultured bacteria DER-204” (Nº acceso en GenBank GQ404432). El análisis de los amplicones obtenidos con los métodos de PCR de los genes *ompA*, *gltA* y *ompB* mostraron una identidad del 100% con *Candidatus R. rioja* (Nº acceso en GenBank GQ404429, GQ404431 y GQ404430, respectivamente).

Higgins y cols. ya apuntaron la elevada conservación de la secuencia del gen ARNr 16S entre las diferentes especies de rickettsia (menos del 3% de divergencia), lo cual hacía imposible establecer diferencias filogenéticas basándose sólo en este gen (Higgins *et al.*, 1996). Este hecho se ha constatado con los resultados que hemos obtenido en este trabajo. Al alinear las secuencias nucleotídicas obtenidas al amplificar este fragmento del gen ARNr 16S de las diferentes *Rickettsias* spp. hemos encontrado que apenas existen cambios. Este fragmento es idéntico en *R. peacockii* y *R. rickettsii*, y tan sólo existen dos mutaciones puntuales entre esta secuencia y la de *R. conorii* (anexo 1).

Los resultados obtenidos muestran que la reacción semianidada del gen *ompA* es la mejor herramienta para amplificar *Rickettsia* spp. en los ejemplares de *D. marginatus* retirados de los pacientes, dada su elevada sensibilidad (92,6 %) y especificidad. Esta diana de PCR ha sido empleada en numerosas ocasiones para detectar *Rickettsia* spp. en *Dermacentor* spp. (Boldis *et al.*, 2008; Márquez, 2008; Selmi *et al.*, 2008; Márquez, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009; Parola *et al.*, 2009; Samoylenko *et al.*, 2009).

En cuanto a la rentabilidad de las muestras. Si bien *Rickettsia* spp., puede ser amplificada en diversos tipos de muestras clínicas, la sangre total tratada con EDTA extraída en la fase temprana de la enfermedad, es la más rentable. En nuestro trabajo, exceptuando los artrópodos, de los que hablaremos más adelante, la sangre con EDTA constituye la muestra en la que hemos conseguido amplificar *Rickettsia* spp. un mayor número de veces. La sangre completa con EDTA en los primeros estadios de la enfermedad también es la muestra preferida por la mayoría

de los autores para el diagnóstico molecular de las rickettsiosis humanas (Tsai KH *et al.*, 2008). Si bien el EDTA suele ser el anticoagulante elegido en la mayoría de los laboratorios, y como hemos comentado, con buenos resultados para la posterior amplificación de rickettsias en la muestra, también se puede detectar rickettsia en las muestras de sangre que utilizan citrato de sodio como anticoagulante. (Brouqui *et al.*, 2004; Zavala-Castro *et al.*, 2008). En algunos casos la amplificación por PCR se ha llevado a cabo a partir de muestras congeladas, bien porque éstas habían llegado al laboratorio en ese estado o bien porque fueron congeladas en el momento del diagnóstico y se descongelaron una vez se dispuso de técnicas diagnósticas mejoradas (Ben-Zvi *et al.*, 2010; Lindblom *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2010).

En caso de no disponer de la muestra de sangre completa con EDTA, en muchos casos el diagnóstico se ha realizado a partir de la muestra de suero por ser ésta la muestra clínica que suele llegar con más frecuencia a los laboratorios. Hay que tener en cuenta que la rentabilidad en esta muestra es menor, ya que las rickettsias son microorganismos intracelulares. En nuestro trabajo se consiguió detectar *Rickettsia* spp. en el 16,6 % de las muestras de suero procesadas, mientras que en el caso de las muestras de sangre tratada con EDTA se consiguió en el 33,3%. En la literatura también encontramos diversas publicaciones en las que han amplificado diferentes especies de rickettsia en las muestras de suero (Nilsson, 2009; Papa *et al.*, 2010).

Otra muestra en la que se obtienen muy buenos resultados son las biopsias de lesiones cutáneas. Este tipo de muestras es más difícil de conseguir, si bien cuando se dispone de ellas, los datos de rentabilidad son muy elevados (Brouqui *et al.*, 2004). Existen varios trabajos en los que el diagnóstico final de rickettsiosis se ha realizado tras la amplificación de *Rickettsia* sp. a partir de una biopsia de un paciente (Fournier *et al.*, 2000a; Mediannikov *et al.*, 2004; Psaroulaki *et al.*, 2005; Fournier *et al.*, 2005; de Sousa *et al.*, 2006; Rolain *et al.*, 2006; Caron *et al.*, 2008; Sfar *et al.*, 2009; Stephany *et al.*, 2009; Socolovschi *et al.*, 2010b; Ando *et al.*, 2010; Spolidorio *et al.*, 2010; Tabara *et al.*, 2011). Normalmente, la biopsia cutánea se extrae de la escara. Recientemente se ha publicado un artículo donde la

detección de rickettsia se ha realizado en una biopsia del exantema (Znazen *et al.*, 2011).

En el diagnóstico molecular de las rickettsiosis, es de máxima importancia la buena conservación de las muestras clínicas antes de su procesamiento (degradación del ADN durante el transporte debido a temperaturas inadecuadas). Por ello, en este trabajo sólo se han procesado las muestras que habían llegado a nuestro laboratorio en óptimas condiciones de tiempo y temperatura (Brouqui *et al.*, 2004), ya que de no ser así, los resultados de sensibilidad obtenidos se hubieran visto afectados. Lo mismo ocurre, con el hecho de que al paciente le haya sido suministrado tratamiento antibiótico antes de que se hayan extraído las muestras. Además, aunque las muestras clínicas estén en buenas condiciones para su procesamiento, poseen numerosos inhibidores (de la ADN polimerasa, enzima encargada de llevar a cabo la reacción de PCR), que dificultan, en gran medida, la amplificación de microorganismos en las muestras. Por ello es de gran ayuda e importancia procesar, en el caso de que se disponga, los artrópodos retirados de los pacientes. En 1999, Roux y Raoult, publicaron un trabajo en el que se ponía de manifiesto la importancia que tenía el procesamiento de los piojos como herramienta para el diagnóstico y la vigilancia de las enfermedades transmitidas por este artrópodo (Roux and Raoult, 1999b). Años más tarde se publicaron “Las Guías Europeas para el diagnóstico de las enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas”, en las que se apuntó la importancia del procesamiento de los artrópodos que se retiran de los pacientes (Brouqui *et al.*, 2004). En nuestra opinión, esta muestra de indudable valor, resulta en numerosas ocasiones la única muestra en la que se consigue amplificar rickettsia. En la muestra estudiada disponíamos de 4 pacientes en los cuales además de otra muestra clínica teníamos la garrapata y, además, teníamos 23 pacientes en los que sólo contábamos con el artrópodo como muestra clínica. En 2005, se publicó un caso en el que se detectó de forma simultánea *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* en la sangre de un paciente y en la garrapata que le había sido retirada (Psaroulaki *et al.*, 2005). En nuestra experiencia este hecho se ha dado en varios casos de FB, en los que disponíamos de la garrapata además de las muestras extraídas de los pacientes (datos no publicados). Otros autores también han recurrido al procesamiento de la garrapata para establecer el diagnóstico definitivo (Méchaï *et al.*, 2009).

La toma de muestras biológicas mediante hisopos también puede utilizarse para la detección de *Rickettsia* spp. (Bechah *et al.*, 2011; Mouffok *et al.*, 2011; Renvoisé *et al.*, 2012). En nuestra experiencia, hemos conseguido amplificar *R. africae* de hisopos que se habían utilizado para limpiar la escara. En 2009 se publicó un trabajo en el que amplificó *R. australis* de un hisopo con el que se había tomado una muestra de la lesión en la mucosa oral (Wang *et al.*, 2009) y recientemente se ha amplificado *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* a partir del ADN extraído de una muestra cutánea recogida mediante un hisopo (Socolovschi *et al.*, 2010b).

En los últimos años, en Europa se han implicado nuevas especies de rickettsia en patología humana. Si bien hasta 1991, la única rickettsiosis transmitida por garrapatas era la FB, en los últimos 10 años se han implicado hasta 10 nuevas especies de rickettsia en diferentes cuadros clínicos. De acuerdo a Raoult y cols. hay que amplificar al menos dos genes diferentes para poder implicar nuevas *Rickettsia* sp. en patología humana (Raoult *et al.*, 2005). En nuestro caso, hemos empleado dos o tres genes diferentes para nombrar o implicar nuevas *Rickettsia* sp. (Oteo *et al.*, 2006b; Portillo *et al.*, 2009; García-García *et al.*, 2010). No sólo es importante utilizar diferentes genes a la hora de implicar nuevos patógenos, también hay que ser riguroso a la hora de detectar especies de rickettsia en vectores que no son los convencionales o en zonas en las que no estaban presentes. Recientemente se ha publicado la presencia de *R. australis*, rickettsia patógena responsable del Tifus por garrapatas de Queensland, en *I. ricinus* en Europa (van Overbeek *et al.*, 2008). Este estudio se llevó a cabo utilizando como diana de PCR un fragmento del gen ARNr 16S. Posteriormente Tjisse-Klasen y cols. compararon el fragmento del gen ARNr 16S amplificado en el trabajo de van Overbeek con las secuencias de *R. australis* y *R. helvetica* en GenBank, apuntando que tan sólo existían 4 cambios nucleotídicos entre la secuencia de *R. australis* y el fragmento amplificado y 7, entre dicho fragmento y la secuencia correspondiente de *R. helvetica*. Además, estos autores amplificaron un fragmento de 729 pb del gen *ompB*, obteniendo una identidad en la secuencia de 100% con *R. helvetica* (Tjisse-Klasen *et al.*, 2010).

Es de gran importancia el hecho de secuenciar los amplicones obtenidos, ya que si no fuera así podrían implicarse erróneamente rickettsias como responsables de diferentes cuadros clínicos. No obstante existen criterios diagnósticos de cómo se deben denominar a las rickettsias y, se debe tener siempre en cuenta, la distribución conocida de las diferentes especies de rickettsias (Raoult *et al.*, 2005).

En este trabajo, además de procesar las 72 muestras clínicas de los pacientes con rickettsiosis, se procesaron 18 garrapatas retiradas de pacientes que no habían desarrollado enfermedad. Si bien en los artrópodos retirados de pacientes encontramos la máxima sensibilidad empleando la reacción de PCR semianidada del gen *ompA* (92,6% de sensibilidad), en el caso de las garrapatas retiradas de pacientes asintomáticos fue la reacción de la PCR del gen *ompB* (94,4% de sensibilidad) la que ofreció mejores resultados.

Mención especial merece el hecho de que la reacción de PCR anidada del gen *ompB* fue la única diana que permitió amplificar *Rickettsia* spp. en *R. bursa*.

En resumen, la amplificación por PCR y posterior secuenciación de diferentes fragmentos de diversos genes rickettsiales constituye una herramienta muy útil para el diagnóstico de rickettsiosis en las fases tempranas de la enfermedad. Se pueden amplificar *Rickettsia* spp. de diferentes muestras clínicas como sangre, suero, biopsias y las garrapatas que aportan los pacientes. La reacción de PCR anidada que utiliza el fragmento del gen *ompB* es un método muy sensible para un primer cribado ya que permite detectar rickettsia en un elevado porcentaje de muestras. La reacción de PCR semianidada que utiliza como diana un fragmento del gen *ompA* es el ensayo más específico para diagnosticar y para implicar nuevas especies de rickettsia en patología humana. No obstante, hay que tener en cuenta la epidemiología, la sintomatología clínica y el vector implicado en la infección para establecer el diagnóstico final de rickettsiosis.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Los estudios realizados en esta Memoria nos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. La PCR se ha mostrado como una herramienta útil para el diagnóstico de rickettsiosis.
2. La reacción de PCR simple que utiliza como diana un fragmento del extremo 5' del gen *gltA* es la mejor herramienta para la detección de *Rickettsia* spp. en muestras clínicas (33,3%) en nuestro medio.
3. Las reacciones de PCR simples que amplifican fragmentos de los genes *gltA* (región central), *ompB* y *htrA* no son buenas herramientas para la detección de *Rickettsia* spp. en las muestras clínicas estudiadas, ya que no detectan este microorganismo en ninguno de los fluidos y biopsias obtenidas de los pacientes.
4. El empleo de PCRs secuenciales (anidadas y semianidadas) mejora considerablemente la sensibilidad de la técnica.
5. La PCR anidada del gen *ompB* es la diana más rentable para la detección de *Rickettsia* spp. en muestras clínicas (83,3%).
6. La realización de los tres ensayos de PCR secuenciales (*ompB*, *gltA* y *ompA*) nos ha permitido la detección de *Rickettsia* spp. en todas las muestras clínicas estudiadas.
7. La PCR anidada del gen *ompA* es la diana que ha mostrado una mayor utilidad para llegar hasta la especie de *Rickettsia*.
8. Las reacciones de PCR que utilizan como diana los fragmentos de los genes ARNr 16S y *htrA* no son adecuadas para la identificación de *Rickettsia* a nivel de especie en *D. marginatus*.

9. Es necesaria una actualización de secuencias de *Rickettsia* spp. en GenBank ya que, de acuerdo a este banco de genes, algunas de las especies de *Rickettsia* que fueron detectadas en nuestras muestras con un elevado porcentaje de identidad, correspondían a *Rickettsia* spp. que no están presentes en nuestro medio.
10. La detección por PCR y posterior secuenciación ha permitido implicar diferentes especies de *Rickettsia* en patología humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JR, Schmidtmann ET, Azad AF. 1990. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouché), with a rickettsia-like microorganism. *Am J Trop Med Hyg.* 43:400-9.

Aguirrebengoa K, Portillo A, Santibáñez S, Marín JJ, Montejo M, Oteo JA. 2008. Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Spain. *Emerg Infect Dis.* 14:528-9.

Aharonowitz G, Koton S, Segal S, Anis E, Green MS. 1999. Epidemiological characteristics of spotted fever in Israel over 26 years. *Clin Infect Dis.* 29:1321-2.

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sirechitz- Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Näslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 396: 133-40.

Ando S, Kurosawa M, Sakata A, Fujita H, Sakai K, Sekine M, Katsumi M, Saitou W, Yano Y, Takada N, Takano A, Kawabata H, Hanaoka N, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T. 2010. Human *Rickettsia heilongjiangensis* infection, Japan. *Emerg Infect Dis.* 16:1306-8.

Angelakis E, Richet H, Rolain JM, 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.

Anton E, Font B, Sanfeliú I, Segura F. 2003. Clinical and laboratory characterises of 144 patients with Mediterranean Spotted Fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22:126-28.

Azad AF, Beard ChB. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vector. *Emerg Infect Dis.* 4:179-86.

Bacellar F, Beati L, França A, Poças J, Regnery R, Filipe A. 1999. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. *Emerg Infect Dis.* 5:835-6.

Baumann D, Pusterla N, Péter O, Grimm F, Fournier PE, Schär G, Bossart W, Lutz H, Weber R. 2003. Fever after a tick bite: clinical manifestations and diagnosis of acute tick bite-associated infections in northeastern Switzerland. *Dtsch Med Wochenschr.* 128:1042-7.

Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: *Ixodidae*) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol.* 87: 32-48.

Beati L, Meskini M, Thiers B, Raoult D. 1997. *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks. *Int J Syst Bacteriol.* 47:548-54.

Beati L, Roux V, Ortuño A, Castella J, Porta FS, Raoult D. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group Rickettsiae isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Clin Microbiol.* 34:2688-94.

Bechah Y, Socolovschi C, Raoult D. 2011. Identification of Rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. *Emerg Infect Dis.* 17: 83-6.

Bella F, Font B, Uriz S, Muñoz T, Espejo E, Traveria J, Serrano JA, Segura F. 1990. Randomized trial of doxycycline versus josamycin for Mediterranean spotted fever. *Antimicrob Agents Chemother.* 34:937-8.

Bell-Sakyi L. 1991. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *J Parasitol.* 77:1006-8.

Ben-Zvi I, Meltzer E, Nogueras MM, Segura F, Bank I. 2010. First detection of human infection with *Rickettsia felis* in Israel. *Am J Med Sci.* 340:343.

Bernabeu-Wittel M, Pachón J, Alarcón A, López-Cortés LF, Viciano P, Jiménez-Mejías ME, Villanueva JL, Torronteras R, Caballero-Granado FJ. 1999. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration: a 17-year study in the South of Spain. *Arch Intern Med.* 159:872-6.

Birg ML, La Scola B, Roux V, Brouqui P, Raoult D. 1999. Isolation of *Rickettsia prowazekii* from blood by shell vial cell culture. *J Clin Microbiol.* 37:3722-4.

Bitam I, Kernif T, Harrat Z, Parola P, Raoult D. 2009. First detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma aegyptium* from Algeria. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:253-4.

Black WC, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard and soft tick taxa (Acari:Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:10034-8

Blanc G, Ogata H, Robert C, Audic S, Claverie JM, Raoult D. 2007. Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsia massiliae* genome. *Genome Res.* 17:1657-64.

Blanco JR, Pérez-Martínez L, Vallejo M, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. 2006. Prevalence of *Rickettsia felis*-like and *Bartonella* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from La Rioja (Northern Spain). *Ann N Y Acad Sci.* 1078:270-4.

Boillat N, Genton B, D'Acremont V, Raoult D, Greub G. 2008. Fatal case of Israeli spotted fever after Mediterranean cruise. *Emerg Infect Dis.* 14:1944-6

Boldis V, Kocianová E, Strus J, Tusek-Znidaric M, Sparagano OA, Stefanidesová K, Spitalská E. 2008. Rickettsial agents in Slovakian ticks (Acarina, *Ixodidae*) and their ability to grow in Vero and L929 cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 1149:281-5.

Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N, Hornok S, Honegger H, Hegglin D, Woelfel R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2009. Molecular investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Appl Environ Microbiol.* 75:3230-7.

Bouyer DH, Stenos J, Crocquet-Valdes P, Moron CG, Popov VL, Zavala-Velazquez JE, Foil LD, Stothard DR, Azad AF, Walker DH. 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 2):339-47.

Bozeman FM, Masiello SA, Williams MS, Elisberg BL. 1975. Epidemic typhus rickettsiae isolated from flying squirrels. *Nature.* 255:545-7.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B; ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella*; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 10:1108-32.

Burgdorfer W. 1982. Lyme disease a tick-borne spirochetosis? *Science.* 216: 1317-19.

Burri C, Dupasquier C, Bastic V, Gern L. 2011. Pathogens of Emerging Tick-Borne Diseases, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., and *Babesia* spp., in *Ixodes* Ticks Collected from Rodents at Four Sites in Switzerland (Canton of Bern). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11:939-44.

Cardenosa N, Roux V, Font B, Sanfeliu I, Raoult D, Segura F. 2000. Short report: isolation and identification of two spotted fever group rickettsial strains from patients in Catalonia, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 62:142-4.

Cardenosa N, Sanfeliu I, Segura F. 1997. Microbiological diagnosis of rickettsial infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 15:32-7.

Caron J, Rolain JM, Mura F, Guillot B, Raoult D, Bessis D. 2008. *Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae* infection and retinal vasculitis. *Emerg Infect Dis.* 14:683-4.

Caruso G, Zasio C, Guzzo F, Granata C, Mondardini V, Guerra E, Macrì E, Benedetti P. 2002. Outbreak of African tick-bite fever in six Italian tourists returning from South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:133-6

Cazorla C, Enea M, Lucht F, Raoult D. 2003. First isolation of *Rickettsia slovacica* from a patient, France. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 135.

Chmielewski T, Podsiadly E, Karbowski G, Tylewska-Wierzbanowska S. 2009. *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerg Infect Dis.* 15:486-8

Choi YJ, Jang WJ, Kim JY, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, Koh YS, Choi MS, Kim IS. 2005a. Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsioses in Humans, South Korea. *Emerg Infec Dis.* 11:237-44.

Choi YJ, Lee SH, Park KH, Koh YS, Lee KH, Baik HS, Choi MS, Kim IS, Jang WJ. 2005b. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12:759-63.

Conor A, Bruch A. 1910. "Une fièvre éruptive observée en Tunisie". *Bull Soc Pathol Exot Filial.* 8: 492-496

de Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, Walker D, Bacellar F. 2006. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 12:1103-8.

de Sousa R, Duque L, Anes M, Poças J, Torgal J, Bacellar F, Olano JP, Walker DH. 2008b. Lymphangitis in a Portuguese patient infected with *Rickettsia sibirica*. *Emerg Infect Dis.* 14:529-30.

de Sousa R, França A, Dória Nóbrega S, Belo A, Amaro M, Abreu T, Poças J, Proença P, Vaz J, Torgal J, Bacellar F, Ismail N, Walker DH. 2008a. Host- and microbe-related risk factors for and pathophysiology of fatal *Rickettsia conorii* infection in Portuguese patients. *J Infect Dis.* 198:576-85.

de Sousa R, Ismail N, Dória-Nóbrega S, Costa P, Abreu T, França A, Amaro M, Proença P, Brito P, Poças J, Ramos T, Cristina G, Pombo G, Vitorino L, Torgal J, Bacellar F, Walker D. 2005. The presence of eschars, but not greater severity, in Portuguese patients infected with Israeli spotted fever. *Ann N Y Acad Sci.* 1063:197-202.

Dib L, Bitam I, Bensouilah M, Parola P, Raoult D. 2009. First description of *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* in Algeria. *Clin Microbiol Infect.* 15:261-2.

Dobler G, Essbauer S, Terzioglu R, Thomas A, Wölfel R. 2008. Prevalence of tick-borne encephalitis virus and rickettsiae in ticks of the district Burgenland, Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 120:45-8.

Dobler G, Essbauer S, Wölfel R. 2009. Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:263-4.

Duan C, Tong Y, Huang Y, Wang X, Xiong X, Wen B. 2011. Complete genome sequence of *Rickettsia heilongjiangensis*, an emerging tick-transmitted human pathogen. *J Bacteriol.* 193:5564-5.

Duh D, Punda-Polic V, Avsic-Zupanc T, Bouyer D, Walker DH, Popov VL, Jelovsek M, Gracner M, Trilar T, Bradaric N, Kurtti TJ, Strus J. 2010. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(Pt 4):977-84.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:2145-65.

Dupont HT, Brouqui P, Faugere B, Raoult D. 1995. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia typhi* in seven African countries. *Clin Infect Dis.* 21:1126-33.

Dupont HT, Cornet JP, Raoult D. 1994. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 50:373-80.

Dworkin MS, Shomaker PC, Anderson DE. 1999. Tick paralysis: 33 human cases in Washington state, 1946-1966. *Clin Infect Dis.* 29:1435-9.

Eldin C, Mediannikov O, Davoust B, Cabre O, Barré N, Raoult D, Parola P. 2011. Emergence of *Rickettsia africae*, Oceania. *Emerg Infect Dis.* 17:100-2.

Elfving K, Olsen B, Bergström S, Waldenström J, Lundkvist A, Sjöstedt A, Mejlom H, Nilsson K. 2010. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. *PLoS One.* 5:e8572.

Ellison DW, Clark TR, Sturdevant DE, Virtaneva K, Porcella SF, Hackstadt T. 2008. Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infect Immun.* 76:542-50.

Eremeeva M, Yu X, Raoult D. 1994a. Differentiation among the spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J Clin Microbiol.* 32:803-10.

Eremeeva ME, Balayeva NM, Raoult D. 1994b. Serological response of patients suffering from primary and recrudescent typhus: comparison of complement fixation reaction, Weil-Felix test, microimmunofluorescence, and immunoblotting. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1:318-24.

Eremeeva ME, Madan A, Shaw CD, Tang K, Dasch GA. 2005. New perspectives on rickettsial evolution from new genome sequences of rickettsia, particularly *R. canadensis*, and *Orientia tsutsugamushi*. *Ann N Y Acad Sci.* 1063:47-63.

Estrada Peña A. 2000. Ixodoidea (Acarina) en la Península Ibérica. Laboratorios Virbac. Madrid. 60pp.

Estrada-Peña A. 1994. Las garrapatas en España: Introducción. Editado Junta de Castilla y León.

Felsheim RF, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2009. Genome sequence of the endosymbiont *Rickettsia peacockii* and comparison with virulent *Rickettsia rickettsii*: identification of virulence factors. *PLoS One.* 4:e8361.

Fernández-Soto P, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R. 2003. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerg Infect Dis.* 9:889-90.

Fernández-Soto P, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A, Sanz RA. 2004. Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23:648-9.

Floris R, Yurtman AN, Margoni EF, Mignozzi K, Boemo B, Altobelli A, Cinco M. 2008. Detection and identification of *Rickettsia* species in the northeast of Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8:777-82.

Font-Creus B, Bella-Cueto F, Espejo-Arenas E, Vidal-Sanahuja R, Muñoz-Espin T, Nolla-Salas M, Casagran-Borrell A, Mercade-Cuesta J, Segura-Porta F. 1985. Mediterranean spotted fever: a cooperative study of 227 cases. *Rev Infect Dis.* 7:635-42.

Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D. 2004. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol.* 42:816-8.

Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu J, Raoult D. 2003a. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 4: 5456-65.

Fournier PE, El Karkouri K, Leroy Q, Robert C, Giumelli B, Renesto P, Socolovschi C, Parola P, Audic S, Raoult D. 2009. Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in *Rickettsia* species may be explained by genome reduction. *BMC Genomics.* 10:166.

Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol.* 40:2176-81.

Fournier PE, Gouriet F, Brouqui P, Lucht F, Raoult D. 2005. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 40:1435-44.

Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. 2000b. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis.* 6:389-92.

Fournier PE, El Karkouri K, Robert C, Médigue C, Raoult D. 2012. Complete genome sequence of *Rickettsia slovaca*, the agent of tick-borne lymphadenitis. *J Bacteriol.* 194:1612.

Fournier PE, Raoult D. 2004. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. *J Clin Microbiol.* 42(8):3428-34

Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. 2006b. Rickettsioses in South Korea, materials and methods. *Emerg Infect Dis.* 12:531.

Fournier PE, Roux V, Caumes E, Donzel M, Raoult D. 1998b. Outbreak of *Rickettsia africae* infections in participants of an adventure race in South Africa. *Clin Infect Dis.* 27:316-23.

Fournier PE, Roux V, Raoult D. 1998a. Phylogenetic analysis of spotted fever group Rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol.* 48:839-49.

Fournier PE, Takada N, Fujita H, Raoult D. 2006a. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56 (Pt 7):1673-5.

Fournier PE, Tissot-Dupont H, Gallais H, Raoult D. 2000a. *Rickettsia mongolotimonae*: a rare pathogen in France. *Emerg Infect Dis.* 6:290-2.

Fournier PE, Xeridat B, Raoult D. 2003b. Isolation of a rickettsia related to Astrakhan fever rickettsia from a patient in Chad. *Ann N Y Acad Sci.* 990:152-7.

Franca A, Amaro M, Bacellar F. 2003. Report of eight cases of fatal and severe Mediterranean Spotted Fever in Portugal. *Ann N Y Acad Sci.* 990:331-43.

Fujisawa T, Kadosaka T, Fujita H, Ando S, Takano A, Ogasawara Y, Kawabata H, Seishima M. 2012. *Rickettsia africae* Infection in a Japanese Traveller with Many Tick Bites. *Acta Derm Venereol.* 92:443-4.

García-García JC, Portillo A, Núñez MJ, Santibáñez S, Castro B, Oteo JA. 2010. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg.* 82:691-2.

Gargili A, Palomar AM, Midilli K, Portillo A, Kar S, Oteo JA. 2012. *Rickettsia* spp. in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis. In press.

Gauci M, Loh RK, Stone BF, Thong YH. 1989. Allergic reactions to the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*: diagnostic evaluation by skin test and radioimmunoassay. Clin Experim Allergy. 19:279-83.

Gaywee J, Sunyakumthorn P, Rodkvamtook W, Ruang-areerate T, Mason CJ, Sirisopana N. 2007. Human infection with *Rickettsia* sp. related to *R. japonica*, Thailand. Emerg Infect Dis. 13:671-3.

Giammanco GM, Vitale G, Mansueto S, Capra G, Caleca MP, Ammatuna P. 2005. Presence of *Rickettsia conorii* subsp. israelensis, the causative agent of Israeli spotted fever, in Sicily, Italy, ascertained in a retrospective study. J Clin Microbiol. 43:6027-31.

Goldwasser RA, Steiman Y, Klingberg W, Swartz TA, Klingberg MA. 1974. The isolation of strains of rickettsiae of the spotted fever group in Israel and their differentiation from other members of the group by immunofluorescence methods. Scand J Infect Dis. 6:53-62.

Hernández Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francès A, Martín-Sánchez MS, Pérez-Arellano JL. 2004 Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. Emerg Infect Dis.10:740-3. Erratum in: Emerg Infect Dis. 2004.10:1708. Emerg Infect Dis. 2004. 10:1353.

Herrero JI, Ruiz R, Walker DH. 1993. The western immunoblotting technique in atypical situations of *Rickettsia conorii* infection. Presentation of 2 cases. Enferm Infecc Microbiol Clin. 11:139-42.

Higgins JA, Radulovic S, Schriefer ME, Azad AF. 1996. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. J Clin Microbiol. 34: 671-4.

Hildebrandt A, Fritsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2011. Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11:533-7.

Holman PJ, Ronald NC. 1980. A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. *Res Vet Sci.* 29:383-7.

Ibarra V, Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Metola L, Eiros JM, Pérez-Martínez L, Sanz M. 2006. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. *Ann N Y Acad Sci.* 1078:206-14.

Ibarra V, Portillo A, Palomar AM, Sanz MM, Metola L, Blanco JR, Oteo JA. 2012. Septic shock in a patient infected with *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, Spain. *Clin Microbiol Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03887.x

Ibarra V, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Márquez J, Oteo JA. 2005. DEBONEL/TIBOLA: is *Rickettsia slovaca* the only etiological agent? *Ann N Y Acad Sci.* 1063:346-8.

Ibarra V. 2007. Características clínico-epidemiológicas y microbiológicas de una nueva enfermedad transmitida por garrapatas: DEBONEL (*Dermacentor Borne Necrosis Erythema Lymphadenopathy*). Tesis Doctoral.

Inokuma H, Ohashi M, Jilintai, Tanabe S, Miyahara K. 2007. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi district, Eastern Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 69:661-4.

Inokuma H, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Igota H, Inoue S. 2008. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *J Wildl Dis.* 44:164-7.

Jado I, Oteo JA, Aldámiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, García-Amil C, Rodríguez-Moreno I, Anda P. 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. Emerg Infect Dis. 13:1405-7.

Jensenius M, Fournier PE, Fladby T, Hellum KB, Hagen T, Priø T, Christiansen MS, Vene S, Raoult D, Myrvang B. 2006b. Sub-acute neuropathy in patients with African tick bite fever. Scand J Infect Dis. 38:114-8.

Jensenius M, Fournier PE, Kelly P, Myrvang B, Raoult D. 2003b. African tick bite fever. Lancet Infect Dis. 3:557-64.

Jensenius M, Fournier PE, Vene S, Hoel T, Hasle G, Henriksen AZ, Hellum KB, Raoult D, Myrvang B; Norwegian African Tick Bite Fever Study Group. 2003a. African tick bite fever in travelers to rural sub-Equatorial Africa. Clin Infect Dis. 36:1411-7.

Jensenius M, Hasle G, Henriksen AZ, Vene S, Raoult D, Bruu AL, Myrvang B. 1999. African tick-bite fever imported into Norway: presentation of 8 cases. Scand J Infect Dis. 31:131-3.

Jensenius M, Parola P, Raoult D. 2006a. Threats to international travellers posed by tick-borne diseases. Travel Med Infect Dis. 4:4-13.

Jilintai, Seino N, Matsumoto K, Hayakawa D, Suzuki M, Hata H, Kondo S, Yokoyama N, Inokuma H. 2008. Serological and molecular survey of Rickettsial infection in cattle and sika deer in a pastureland in Hidaka District, Hokkaido, Japan. Jpn J Infect Dis. 61:315-7.

Jufresa J, Alegre J, Surinach JM, Aleman C, Recio J, Juste C, Fernández Sevilla T. 1997. Clinical study of 86 patients with Mediterranean boutonneuse fever who were admitted in a university general hospital. An Med Interna. 14: 328-31.

Kelly PJ. 2006. *Rickettsia africae* in the West Indies. Emerg Infect Dis. 12:224-6.

Kurtti TJ, Munderloh UG, Krueger DE, Johnson RC, Schwan TG. 1993. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. J Med Entomol. 30:586-96.

La Scola B, Raoult D. 1996. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year followup. J Clin Microbiol. 34:2722-7.

La Scola B, Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. J Clin Microbiol. 35: 2715-27.

La Scola B, Rydkina L, Ndiokubwayo JB, Vene S, Raoult D. 2000. Serological differentiation of murine typhus and epidemic typhus using cross-adsorption and Western blotting. Clin Diagn Lab Immunol. 7:612-6.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. 2004. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever is Endemic. J Clin Microbiol. 42:90-8.

Layne F, Diez F, Yélamos F, Collado A. 1994. Fiebre botonosa mediterránea asociada a coagulación intravascular diseminada. A propósito de 3 casos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 12:365-6.

Leitner M, Yitzhaki S, Rzotkiewicz S, Keysary A. 2002. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. Am J Trop Med Hyg. 67: 166-9.

Li AY, Adams PJ, Abdad MY, Fenwick SG. 2010. High prevalence of *Rickettsia gravesii* sp. nov. in *Amblyomma triguttatum* collected from feral pigs. *Vet Microbiol.* 146:59-62.

Li H, Walker DH. 1998. rOmpA is a critical protein for the adhesion of *Rickettsia rickettsii* to host cells. *Microb Pathog.* 24:289-98.

Lim MY, Brady H, Hambling T, Sexton K, Tompkins D, Slaney D. 2012. *Rickettsia felis* infections, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 18:167-9.

Lindblom A, Severinson K, Nilsson K. 2010. *Rickettsia felis* infection in Sweden: report of two cases with subacute meningitis and review of the literature. *Scand J Infect Dis.* 42:906-9.

Ma JS. 2006. Rickettsioses in South Korea, data analysis. *Emerg Infect Dis.* 12:531-2.

Maina AN, Knobel DL, Jiang J, Halliday J, Feikin DR, Cleaveland S, Ng'ang'a Z, Junghae M, Breiman RF, Richards AL, Njenga MK. 2012. *Rickettsia felis* infection in febrile patients, western Kenya, 2007-2010. *Emerg Infect Dis.* 18:328-31.

Manilla G. 1998. Fauna D'Italia Ixodida. Calderini. 1-280. Bologna.

Márquez FJ, Hidalgo A, Contreras F, Rodríguez JJ, Muniain MA. 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodia) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23:94-102.

Márquez FJ, Muniain MA, Pérez JM, Pachón J. 2002. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. *Emerg Infect Dis.* 8:89-91.

Márquez FJ, Muniain MA, Soriguer RC, Izquierdo G, Rodríguez-Baño J, Borobio MV. 1998. Genotypic identification of an undescribed spotted fever Group *Rickettsia* in *Ixodes ricinus* from southwestern Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 58:570-77.

Márquez FJ. 2008. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. *Exp Appl Acarol.* 45:185-94.

Márquez FJ. 2009. Rickettsiae in ticks from wild ungulates of Sierra Nevada and Doñana national parks (Spain). *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:227-9.

Marrero M, Raoult D. 1989. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *Am J Trop Med Hyg.* 40:197-9.

Martín Farfán A, Juárez Fernández C, Calbo Torrecillas F, Porrás Ballesteros J, Díaz Recio M, Bermúdez Recio F. 1985. Clinico-epidemiological study of 164 cases of boutonneuse fever. *Rev Clin Esp.* 176:333-9.

Matsumoto K, Grzeszczuk A, Brouqui P, Raoult D. 2009. *Rickettsia raoultii* and *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from Bialowieza Primeval Forest European bison (*Bison bonasus bonasus*), Poland. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:286-7.

McLeod MP, Quin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK, Fox GE, McNeill TZ, Jiang H, Muzny D, Jacob LS, Hawes AC, Sodergren E, Gill R, Hume J, Morgan M, Fan G, Amin AG, Gibbs RA, Hong C, Yu XJ, Walker DH, Weinstock GM. 2004. Complete Genome Sequence of *Rickettsia typhi* and Comparison with Sequences of Other Rickettsiae. *J Bacteriol.* 186: 5842–55.

Méchai F, Revest M, Lanternier F, Rolain JM, Viard JP, Lortholary O, Lecuit M. 2009. Emergence of *Rickettsia slovaca* infection in Brittany, France. *Clin Microbiol Infect.* 15 (Suppl 2): 230-1.

- Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, Drancourt M, Roux V, Rydkina E, Davoust B, Tarasevich I, Brouqui P, Fournier PE.** 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:1635-9.
- Mediannikov OY, Sidelnikov Y, Ivanov L, Mokretsova E, Fournier PE, Tarasevich I, Raoult D.** 2004. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. *Emerg Infect Dis.* 10:810-7.
- Mendes do Nascimento EM, Colombo S, Nagasse-Sugahara TK, Angerami RN, Resende MR, da Silva LJ, Katz G, dos Santos FC.** 2009. Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:232-4.
- Merhej V, Raoult D.** 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 86:379-405.
- Miguélez M, Laynez P, Linares M, Hayek M, Abella L, Marañez I.** 2003. Murine typhus in Tenerife. Clinicoepidemiological study and differential clinical features with Q fever. *Med Clin (Barc).* 121:613-5.
- Mokrani N, Parola P, Tebbal S, Dalichaouche M, Aouati A, Raoult D.** 2008. *Rickettsia aeschlimannii* infection, Algeria. *Emerg Infect Dis.* 14:1814-5
- Mora A, Viguera I, Enríquez R, Escolano CM.** 1995. Fiebre botonosa mediterránea maligna: persistencia del parásito vector e implicación pronóstica. *Rev Clin Esp.* 195:62.
- Mouffok N, Socolovschi C, Benabdellah A, Renvoise A, Parola P, Raoult D.** 2011. Diagnosis of rickettsioses from eschar swab samples, Algeria. *Emerg Infect Dis.* 17:1968-9.
- Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtti TJ.** 1994. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol.* 80:533-43.

Mura A, Masala G, Tola S, Satta G, Fois F, Piras P, Rolain JM, Raoult D, Parola P. 2008. First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, '*Candidatus Rickettsia barbariae*', in ticks from Sardinia, Italy. *Clin Microbiol Infect.* 14:1028-33.

Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci.* 14:2857-77.

Ngwamidiba M, Blanc G, Raoult D, Fournier PE. 2006. Sca1, a previously undescribed paralog from autotransporter protein-encoding genes in *Rickettsia* species. *BMC Microbiol.* 20;6:12.

Nijhof AM, Bodaan C, Postigo M, Nieuwenhuijs H, Opsteegh M, Franssen L, Jebbink F, Jongejan F. 2007. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:585-95.

Nilsson K, Elfving K, Pahlson C. 2010. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis.* 16:490-2.

Nilsson K, Lindquist O, Pålson C. 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet.* 354:1169-73.

Nilsson K, Pålson C, Lukinius A, Eriksson L, Nilsson L, Lindquist O. 2002. Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J Infect Dis.* 185:1128-38.

Nilsson K. 2009. Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J Infect.* 58:79-82.

Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, Fournier PE, Barbe V, Samson D, Roux V, Cossart P, Weissenbach J, Claverie JM, Raoult D. 2001. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science.* 293:2093-8.

Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. 2006. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet.* 2:e76.

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

Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CC, Silva A Jr, Almeida MR, Almada G, Bouyer DH, Galvão MA, Mafra C. 2008. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103:191-4.

Oliveira RP, Galvao MAM, Mafra CL, Chamone CB, Calic SB, Silva SU, Walker DH. 2002. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 8:317-19.

Oteo JA, Estrada-Peña A, Ortega-Pérez C, Martínez de Artola V. 1996. Mediterranean spotted fever: a preliminary tick field study. *Eur J Epidemiol.* 12:475-8.

Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR, Martínez de Artola V, Márquez FJ, Portillo A, Raoult D, Anda P. 2004a. *Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. *Clin Microbiol Infect.* 10:327-31.

Oteo JA, Ibarra V. 2002. DEBONEL (*Dermacentor*-borne-necrosis-erythema-lymphadenopathy). ¿Una nueva enfermedad transmitida por garrapatas? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2:51-2.

Oteo JA, Portillo A, Blanco JR, Ibarra V, Santibáñez S. 2004b. *Rickettsia africae* infection. Three cases confirmed by PCR. *Med Clin.* 122:786-8.

Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Ibarra V. 2006b. Cluster of cases of Human *Rickettsia felis* Infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol.* 44: 2669-71.

Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Pérez-Martínez L, Blanco JR, Jiménez S, Ibarra V, Pérez-Palacios A, Sanz M. 2006a. Prevalence of spotted fever group *Rickettsia* species detected in ticks in La Rioja, Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 1078:320-3.

Oteo JA. 1995. Garrapatas: cien años como vector. *Rev Clin Esp.* 195:1-2.

Oteo JA. 2010. Fever of intermediate duration: new times, new tools and change of spectrum. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28:407-408.

Pacheco RC, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabó MP, Catroxo MH, Bouyer DH, Labruna MB. 2011. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 77:5207-11.

Palomar AM, Santibáñez P, Mazuelas D, Roncero L, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. 2012. Role of Birds in Dispersal of Etiologic Agents of Tick-borne Zoonoses, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis.* 18:1188-91.

Papa A, Dalla V, Petala A, Maltezou HC, Maltezos E. 2010. Fatal Mediterranean spotted fever in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 16:589-592.

Parola P, Miller RS, McDaniel P, Telford SR 3rd, Rolain JM, Wongsrichanalai C, Raoult D. 2003. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. *Emerg Infect Dis.* 9:592-5.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. 2005. Tick borne Rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 8: 719-56.

Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 32:897-928.

Parola P, Rovey C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. 2009. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. *Emerg Infect Dis.* 15:1105-8.

Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, Labauge P, Raoult D. 2008. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2:e338.

Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, Hemmersbach-Miller M, Martín AM, Raoult D. 2005. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 11:1961-4.

Pérez-Pérez L, Portillo A, Allegue F, Zulaica A, Oteo JA, Caeiro JL, Fabeiro JM. 2010. *Dermacentor*-borne Necrosis Erythema and Lymphadenopathy (DEBONEL): A case associated with *Rickettsia rioja*. *Acta Derm Venereol.* 90:214-5.

Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hughes LE, Bell EJ. 1978. Serologic typing of Rickettsiae of spotted fever group by microimmunofluorescence. *J Immunol.* 121:1961-8.

Phongmany S, Rolain JM, Phetsouvanh R, Blacksell SD, Soukkhaseum V, Rasachack B, Phiasakha K, Soukkhaseum S, Frichithavong K, Chu V, Keolouanghot V, Martinez-Aussel B, Chang K, Darasavath C, Rattavong O, Sisouphone S, Mayxay M, Vidamaly S, Parola P, Thammavong C, Heuangvongsy M, Syhavong B, Raoult D, White NJ, Newton PN. 2006. Rickettsial infections and fever, Vientiane, Laos. *Emerg Infect Dis.* 12:256-62.

Pluta S, Tewald F, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U. 2009. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. *Emerg Infect Dis.* 15:2077-8.

Portillo A and Oteo JA. 2012. Rickettsiosis as Threat for the Traveller, Current Topics in Tropical Medicine, Alfonso J. Rodriguez-Morales (Ed.), ISBN:978-953-51-0274-8, InTech, Available from

<http://www.intechopen.com/books/current-topics-intropicalmedicine/rickettsiosis-as-threat-for-the-traveller>

Portillo A, Ibarra V, Santibáñez S, Pérez-Martínez L, Blanco JR, Oteo JA. 2009. Genetic characterisation of *ompA*, *ompB* and *gltA* genes from *Candidatus* *Rickettsia rioja*. Clin Microbiol Infect. 15 Suppl 2:307-8.

Portillo A, Pérez-Martínez L, Santibáñez S, Blanco JR, Ibarra V, Oteo JA. 2007. Detection of *Rickettsia africae* in *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* ticks from the Republic of Botswana, South Africa. Am J Trop Med Hyg. 77:376-7.

Portillo A, Santibáñez P, Santibáñez S, Pérez-Martínez L, Oteo JA. 2008. Detection of *Rickettsia* spp. in *Haemaphysalis* ticks collected in La Rioja, Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 8:653-8.

Pretorius AM, Birtles RJ. 2002. *Rickettsia aeschlimannii*: A new pathogenic spotted fever group rickettsia, South Africa. Emerg Infect Dis. 8:874.

Pretorius AM, Birtles RJ. 2004. *Rickettsia mongolotimonae* infection in South Africa. Emerg Infect Dis. 10:125-6.

Psaroulaki A, Germanakis A, Gikas A, Scoulica E, Tselentis Y. 2005. Simultaneous detection of "*Rickettsia mongolotimonae*" in a patient and in a tick in Greece. J Clin Microbiol. 43:3558-9.

Radulovic S, Higgins JA, Jaworski DC, Dasch GA, Azad AF. 1995. Isolation, cultivation, and partial characterization of the ELB agent associated with cat fleas. Infect Immun. 63:4826-9.

Radulović Z, Chochlakis D, Tomanović S, Milutinović M, Tselentis Y, Psaroulaki A. 2011. First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11:111-5.

Raoult D, Brouqui P, Roux V. 1996. A new spotted-fever-group rickettsiosis. *Lancet.* 348:412.

Raoult D, Dasch GA. 1995. Immunoblot cross-reactions among *Rickettsia*, *Proteus* spp. and *Legionella* spp. in patients with Mediterranean spotted fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 11:13-8.

Raoult D, Fournier PE, Abboud P, Caron F. 2002b. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerg Infect Dis.* 8:748-9.

Raoult D, Fournier PE, Ereemeeva M, Graves S, Kelly PJ, Oteo JA, Sekeyova Z, Tamura A, Tarasevich I, Zhang L. 2005. Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1063:1-12.

Raoult D, Fournier PE, Fenollar F, Jensenius M, Prioe T, de Pina JJ, Caruso G, Jones N, Laferl H, Rosenblatt JE, Marrie TJ. 2001a. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *N Engl J Med.* 344:1504-10.

Raoult D, La Scola B, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, Galvao MA, de Lamballerie X. 2001b. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis.* 7(1):73-81.

Raoult D, Lakos A, Fenollar F, Beytout J, Brouqui P, Fournier PE. 2002a. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. *Clin Infect Dis.* 34:1331-6.

Raoult D, Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 10:694-719.

Raoult D, Zuchelli P, Weiller PJ, Charrel C, San Marco JL, Gallais H, Casanova P. 1986. Incidence, clinical observations and risk factors in the severe form of Mediterranean spotted fever among patients admitted to hospital in Marseilles 1983-1984. *J Infect.* 12:111-6.

Raoult D. 2003. *Rickettsia slovaca* e infecciones asociadas. En: Bouza E y Picazo JJ. *Infección 2003*. Bilbao: Servisistem 2000 SL:11-30.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 173:1576-89.

Rehacek J. 1984. *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology. *Acta SC Nat Brno.* 18:1-50.

Renvoisé A, Joliot AY, Raoult D. 2009. *Rickettsia felis* infection in man, France. *Emerg Infect Dis.* 15:1126-7.

Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. 2012. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 64:126-9.

Richards AL, Jiang J, Omulo S, Dare R, Abdirahman K, Ali A, Sharif SK, Feikin DR, Breiman RF, Njenga MK. 2010. Human Infection with *Rickettsia felis*, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 16:1081-6.

Richter D, Allgower R, Matuschka FR. 2002a. Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg Infect Dis.* 8: 1421-26.

Richter J, Fournier PE, Petridou J, Häussinger D, Raoult D. 2002b. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis.* 8:207-8.

Ricketts HT. 1906. The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood tick (*Dermacentor occidentalis*). *JAMA.* 47:358.

Ricketts HT. 1909. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. *Med Rec.* 76:843–55.

Rios JJ, Diaz-Cano SJ, Aguilar J, González-Cámpora R. 1992. Fiebre botonosa mediterránea de evolución fatal. *Med Clin (Barc).* 98:355

Roch N, Epaulard O, Pelloux I, Pavese P, Brion JP, Raoult D, Maurin M. 2008. African tick-bite fever in elderly patients: 8 cases in French tourists returning from South Africa. *Clin Infect Dis.* 47:e28-35.

Rolain JM, Mathai E, Lepidi H, Somashekar HR, Mathew LG, Prakash JA, Raoult D. 2006. "*Candidatus Rickettsia kellyi*," India. *Emerg Infect Dis.* 12:483-5.

Romer Y, Seijo AC, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Nash RR, Paddock CD. 2011. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 17:1169-73.

Roux V, Fournier PE, Raoult D. 1996. Differentiation of Spotted Fever Group Rickettsiae by Sequencing and Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA of the Gene Encoding the Protein rOmpA. *J Clin Microbiol.* 34:2058-65.

Roux V, Raoult D. 1999a. Phylogenetic analysis and taxonomic relationships among the genus *Rickettsia*. In *Rickettsia and rickettsial diseases as the turn of the third millennium* (Raoult D, Brouqui P, eds). Paris: Elsevier:52-66.

Roux V, Raoult D. 1999b. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging diseases. *J Clin Microbiol.* 37:596-9.

Roux V, Raoult D. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer surface protein rOmpB (*ompB*). *Int J System Evol Microbiol.* 50: 1449-55.

Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 47:252-61.

Rovero C, Brouqui P, Raoult D. 2008. Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerg Infect Dis.* 14:1360-7.

Rydkina E, Roux V, Rudakov N, Gafarova M, Tarasevich I, Raoult D. 1999. New *Rickettsiae* in ticks collected in territories of the former Soviet Union. *Emerg Infect Dis.* 5:811-4.

Saah AJ. 2002. Introducción a las rickettsiosis y las erliquiosis. En: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R, eds. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades Infecciosas principios y práctica. 5ª ed. Madrid: Panamericana. 2469-71.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

Samoylenko I, Shpynov S, Raoult D, Rudakov N, Fournier PE. 2009. Evaluation of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:305-6.

Sanogo YO, Davoust B, Parola P, Camicas JL, Brouqui P, Raoult D. 2003. Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks removed from game pigs (*Sus scrofa*) in southern France. *Ann N Y Acad Sci.* 990:191-5.

Santibáñez S, Ibarra V, Portillo A, Blanco JR, Martínez de Artola V, Guerrero A, Oteo JA. 2006. Evaluation of IgG antibody response against *Rickettsia conorii* and *Rickettsia slovaca* in patients with DEBONEL/TIBOLA. *Ann N Y Acad Sci.* 1078:570-2.

Sarih M, Socolovschi C, Boudebouch N, Hassar M, Raoult D, Parola P. 2008. Spotted fever group rickettsiae in ticks, Morocco. *Emerg Infect Dis.* 14:1067-73.

Sashika M, Abe G, Matsumoto K, Inokuma H. 2010. Molecular survey of rickettsial agents in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63:353-4

Saz JV, Bacellar F, Merino FJ, Filipe A. 1993. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conorii* infection in the province of Soria. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 11:469-73.

Sculler A. 1997. Mediterranean Boutonneuse fever. *An Med Interna.* 14: 325-7.

Schmulewitz L, Moumile K, Patey-Mariaud de Serre N, Poirée S, Gouin E, Mechai F, Cocard V, Mamzer-Bruneel MF, Abachin E, Berche P, Lortholary O, Lecuit M. 2008. Splenic rupture and malignant Mediterranean spotted fever. *Emerg Infect Dis.* 14:995-7.

Schriefer ME, Sacci JB, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF. 1994b. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol.* 32: 949-54.

Schriefer ME, Sacci JB, Taylor JP, Higgins JA, Azad AF. 1994a. Murine typhus: updated roles of multiple urban components and a second typhus-like rickettsia. *J Med Entomol.* 31:681-5.

Segura-Porta F, Diestre-Ortin G, Ortuño-Romero A, Sanfeliu-Sala I, Font-Creus B, Muñoz-Espin T, de Antonio EM, Casal-Fábrega J. 1998. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur J Epidemiol.* 14:395-8.

Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 4):1353-60.

Sekeyová Z, Roux V, Xu W, Reháček J, Raoult D. 1998. *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 48:1455-62.

Selmi M, Bertolotti L, Tomassone L, Mannelli A. 2008. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* and tick-borne lymphadenopathy, Tuscany, Italy. *Emerg Infect Dis.* 14:817-20.

Sentausa E, El Karkouri K, Robert C, Raoult D, Fournier PE. 2012. Genome Sequence of "*Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae*". *J Bacteriol.* 194:2389-90.

Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K. 2010. Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit Vectors.* 3:66.

Sfar N, Kaabia N, Letaïef A, Rolain JM, Parola P, Bouattour A, Raoult D. 2009. First molecular detection of *R. conorii* subsp. *conorii* 99 years after the Conor description of Mediterranean spotted fever, in Tunisia. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:309-10.

Shpynov S, Fournier PE, Rudakov N, Tankibaev M, Tarasevich I, Raoult D. 2004. Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*," *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. *J Clin Microbiol.* 42:2221-3.

Shpynov S, Parola P, Rudakov N, Samoilenko I, Tankibaev M, Tarasevich I, Raoult D. 2001. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae in *Dermacentor* ticks from Russia and Central Kazakhstan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20:903-5.

Shpynov S, Rudakov N, Tohkov Y, Matushchenko A, Tarasevich I, Raoult D, Fournier PE. 2009. Detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma marginatum* ticks in western Russia. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:315-6.

Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Küchenhoff H, Pfister K. 2008. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. *J Med Entomol.* 45:948-55.

Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl Environ Microbiol.* 68:4559-66.

Socolovschi C, Barbarot S, Lefebvre M, Parola P, Raoult D. 2010b. *Rickettsia sibirica mongolitimonae* in traveler from Egypt. *Emerg Infect Dis.* 16:1495-6.

Socolovschi C, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Diatta G, Bassene H, Trape JF, Raoult D. 2010a. *Rickettsia felis*-associated unruptive fever, Senegal. *Emerg Infect Dis.* 16:1140-2.

Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. 2010. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 16:521-3.

Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW. 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors.* 2:41.

Stańczak J, Racewicz M, Michalik J, Cieniuch S, Sikora B, Skoracki M. 2009. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 2:328-9.

Stenos J, Roux V, Walker D, Raoult D. 1998. *Rickettsia honei* sp. nov., the aetiological agent of Flinders Island spotted fever in Australia. *Int J Syst Bacteriol.* 48:1399-404.

Stephany D, Buffet P, Rolain JM, Raoult D, Consigny PH. 2009. *Rickettsia africae* infection in man after travel to Ethiopia. *Emerg Infect Dis.* 15:1867-70.

Stothard DR, Clark JB, Fuerst PA. 1994. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *Int J Syst Bacteriol.* 44:798-804.

Svendsen CB, Krogfelt KA, Jensen PM. 2009. Detection of *Rickettsia* spp. in Danish ticks (Acari: *Ixodes ricinus*) using real-time PCR. *Scand J Infect Dis.* 41:70-2.

Svendsen CB, Milman N, Andersen CB, Rasmussen EM, Thomsen VØ, Krogfelt KA. 2011. Is sarcoidosis a rickettsiosis? An archival study. *Scand J Infect Dis.* 43:349-53.

Tabara K, Kawabata H, Arai S, Itagaki A, Yamauchi T, Katayama T, Fujita H, Takada N. 2011. High incidence of rickettsiosis correlated to prevalence of *Rickettsia japonica* among *Haemaphysalis longicornis* tick. *J Vet Med Sci.* 73:507-10.

Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 45:589-591.

Tapia. 1929. Fiebre mediterránea. *Arch de Med Madrid.* 25-29.

Teyssere N, Raoult D. 1992. Comparison of Western immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of Mediterranean spotted fever. *J Clin Microbiol.* 30:455-60.

Tijssse-Klasen E, Fonville M, van Overbeek L, Reimerink JH, Sprong H. 2010. Exotic Rickettsiae in *Ixodes ricinus*: fact or artifact? *Parasit Vectors.* 3:54.

Tijssse-Klasen E, Jameson LJ, Fonville M, Leach S, Sprong H, Medlock JM. 2011. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK. *Epidemiol Infect.* 139:524-9.

Tsai KH, Lu HY, Huang JH, Fournier PE, Mediannikov O, Raoult D, Shu PY. 2009. African tick-bite Fever in a Taiwanese traveler returning from South Africa: molecular and serologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 81:735-9.

Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Shu PY. 2008. Human case of *Rickettsia felis* infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 14:1970-2.

Uchiyama T. 1999. Role of major surface antigens of *Rickettsia japonica* in the attachment to host cell. In *Rickettsiae and Rickettsial diseases.* (Kazar J and Raoult D, eds.). Bratislava, Publishing house of the Slovak Academy of Sciences. 182-8.

van Overbeek L, Gassner F, van der Plas CL, Kastelein P, Nunes-da Rocha U, Takken W. 2008. Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol Ecol.* 66:72-84.

Vestris G, Rolain JM, Fournier PE, Birg ML, Enea M, Patrice JY, Raoult D. 2003. Seven years' experience of isolation of *Rickettsia* spp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay. *Ann N Y Acad Sci.* 990:371-4.

Vitale G, Mansueto S, Rolain JM, Raoult D. 2006. *Rickettsia massiliae* Human Isolation. *Emerg. Infect. Dis.* 12:174-5.

Walker DH, Raoult D. 2002. *Rickettsia rickettsii* y otras rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (Fiebre manchada de las Montañas Rocosas y otras fiebres manchadas. En: Mandell GL, Benett JE; Dollin R, eds. *Mandell Douglas y Benett. Enfermedades infecciosas principios y práctica.* 5ª ed. Madrid: Panamericana. 2471-80.

Walker DH. 1990. The role of host factors in the severity of spotted fever and typhus rickettsioses. *Ann N Y Acad Sci.* 590:10-9.

Wang JM, Hudson BJ, Watts MR, Karagiannis T, Fisher NJ, Anderson C, Roffey P. 2009. Diagnosis of Queensland tick typhus and African tick bite fever by PCR of lesion swabs. *Emerg Infect Dis.* 15:963-5.

Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 28:530-4.

Weinberger M, Keysary A, Sandbank J, Zaidenstein R, Itzhaki A, Strenger C, Leitner M, Paddock CD, Eremeeva ME. 2008. Fatal *Rickettsia conorii* subsp. *israelensis* infection, Israel. *Emerg Infect Dis.* 14:821-4.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA Lane DJ. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol.* 173: 697-703.

Whitman TJ, Richards AL, Paddock CD, Tamminga CL, Sniezek PJ, Jiang J, Byers DK, Sanders JW. 2007. *Rickettsia parkeri* infection after tick bite, Virginia. *Emerg Infect Dis.* 13:334-6.

Woese CR, Kandler O, Wheelis M. 1990. Towards a natural system of organism: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 4576-79.

Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox JE. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol.* 6:143-51.

Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51:221-71.

Xicoy B, Tomasa TM, Sarmiento X. 2000. Hemorragia pulmonar masiva secundaria a vasculitis por *Rickettsia conorii*. *Med Intensiva.* 24: 86-7.

Yu X, Jin Y, Fan M, Xu G, Liu Q, Raoult D. 1993. Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. *J Clin Microbiol.* 31:83-8.

Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, León JJ, Walker DH, Zavala-Velázquez JE. 2008. An increase in human cases of spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico, involving children. *Am J Trop Med Hyg.* 79:907-10.

Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker D, Pérez-Osorio J, Peniche-Lara, G. 2009. Severe human infection with *Rickettsia felis* associated with hepatitis in Yucatan, Mexico. *Int J Med Microbiol.* 299:529-33.

Zavala-Velázquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sánchez-Elias RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. 2000. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatán. *Lancet.* 356:1079-80.

Zhu Y, Fournier PE, Ereemeeva M, Raoult D. 2005. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol.* 5:11.

Znazen A, Hammami B, Lahiani D, Ben Jemaa M, Hammami A. 2011. Israeli spotted Fever, Tunisia. *Emerg Infect Dis.* 17:1328-30.

Znazen A, Rolain JM, Hammami A, Jemaa MB, Raoult D. 2006. *Rickettsia felis* infection, Tunisia. *Emerg Infect Dis.* 12:138-40.

ANEXO

Clustal *gltA* (región central)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
RHIPac6  --- GGGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGATTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
RHIPac51  --- GGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGATTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
RHIPac52  --- GGGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGATTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
DERPac41  -----
DERPac42  --- GGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
DERPac43  --- TGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
DERPac46  --- GGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
DERPac50  --- TGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
DERasin3  --- AGGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
HYAasin1  --- TTATGGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGTGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
HYAasin2  --- TGGGCCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGTGGTAATAAAATGCTTTAAAGAAATCGGTAGTTCAGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTA
Clustal
```

```

     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
RHIPac6  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
RHIPac51  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
RHIPac52  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
DERPac41  --- TGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
DERPac42  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
DERPac43  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
DERPac46  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
DERPac50  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
DERasin3  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
HYAasin1  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
HYAasin2  --- AGGATAAAAAATGATCCATTTAGGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAAATGATGACCCGCGTGCCGAGTACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGT
Clustal
*****_*****
```

```

     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
RHIPac6  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
RHIPac51  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
RHIPac52  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
DERPac41  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
DERPac42  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
DERPac43  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
DERPac46  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
DERPac50  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
DERasin3  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
HYAasin1  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
HYAasin2  --- ATTAAGGAACTCAGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAAATAGCAAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAA
Clustal
*****_*****
```

```

     310     320     330     340     350     360     370     380     390
RHIPac6  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
RHIPac51  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
RHIPac52  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
DERPac41  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
DERPac42  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
DERPac43  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
DERPac46  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
DERPac50  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
DERasin3  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
HYAasin1  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
HYAasin2  --- TTATATCCAAATGTTGATTTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTCACTGTACTTTTTGCAATTAATA
Clustal
*****_*****
```


Clustal ompa

```
10 20 30 40 50 60 70 80 90 101
EDPac13      -----TCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
RHPac6       -----CTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACA-CAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
RHPac51      ---ATGGCGAATTTTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
RHPac52      ---ATGGCGAATTTTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
DERPac1      -----TATTTTACCCCACTTCAAACCCGAGCGATAATGCTGAG
DERPac40     TTTTATGGCGAATTTTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
DERPac41     -----TACAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
DERPac42     -----TACAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
DERPac43     ---TTGGCGAATTTTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
DERPac50     -----TTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
DERasin3     ---TATGGCGAATTTTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CCGCAGCGATAATGCTGAG
RHIasin3     -TGTATGGCGAATTTTCTCCAAAATTTTCAAAAAGCAATACAACAAAGGCTTAAAGCCGCTTTATTACCACCTCAA-CTGCAGCGATAATGCTGAG
Clustal Cc   *****
```

```
110 120 130 140 150 160 170 180 190 201
EDPac13      TAGTAGCGGGGCACTCGGTATTGCTGTTTCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAAT---TGGAATGAGATA
RHPac6       TAGTAGCGGGGCACTCGGTATTGCTGTTTCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
RHPac51      TAGTAGCGGGGCACTCGGTATTGCTGTTTCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
RHPac52      TAGTAGCGGGGCACTCGGTATTGCTGTTTCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
DERPac1      TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAAT---GCAGCATTAGTGATCTTTCCTGTTGGCAATAATTGGAATGAGATA
DERPac40     TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
DERPac41     TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
DERPac42     TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
DERPac43     TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
DERPac50     TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
DERasin3     TAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTG---CAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATA
RHIasin3     TAGTAGCGGGTACTCGGTGTTGCTG---TAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTGATCTTTCCTGTTGGCAATAATTGGAATGATA
Clustal Cc   *****
```

```
210 220 230 240 250 260 270 280 290 301
EDPac13      ACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTCGCGGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGTAGCCG
RHPac6       ACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTCACGGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGTAGCCG
RHPac51      ACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTCACGGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGTAGCCG
RHPac52      ACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTCACGGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGTAGCCG
DERPac1      ACGGCTGAGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGTGGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGAAGCAG
DERPac40     ACGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCAGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGCAGCCG
DERPac41     ACGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCAGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGCAGCCG
DERPac42     ACGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCAGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGCAGCCG
DERPac43     ACGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCAGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGCAGCCG
DERPac50     ACGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCAGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGCAGCCG
DERasin3     ACGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCAGTCTCAAACAATTTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGCAGCCG
RHIasin3     ACGGCTCAAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGTTGACGGTCTCAAATGTTGGCATTACTTACGGTGGTGATTATACATCACTGCAGATGAAGCCG
Clustal Cc   *****
```

```
310 320 330 340 350 360 370 380 390 401
EDPac13      ATCATATTTACGGCTATAAATGTTGCGGATACTACTCCCATAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
RHPac6       ATCATATTTACGGCTATAAATGTTGCGGATACTACTCCCATAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
RHPac51      ATCATATTTACGGCTATAAATGTTGCGGATACTACTCCCATAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
RHPac52      ATCATATTTACGGCTATAAATGTTGCGGATACTACTCCCATAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERPac1      GTCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERPac40     ATCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERPac41     ATCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERPac42     ATCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERPac43     ATCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERPac50     ATCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
DERasin3     ATCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
RHIasin3     GTCGTATTTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGCTCAAATATTGCTCAAATAACCGTCGTTGGTTGATTTGTAACGGGAGGTAACCTT
Clustal Cc   *****
```

```

          410          420          430          440          450          460          470          480          490          500
EDPac13  -----TACTATTACTGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGATGCTGCAAATCATGGTTTTGGTCTCCTGCCGATAATTATACA
RHIPac6  GTTGCCCTGTTACTATTACTGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGATGCTGCAAATCATGGTTTTGGTCTCCTGCCGATAATTATACA
RHIPac51 GTTGCCCTGTTACTATTACTGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGATGCTGCAAATCATGGTTTTGGTCTCCTGCCGATAATTATACA
RHIPac52 GTTGCCCTGTTACTATTACTGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGATGCTGCAAATCATGGTTTTGGTCTCCTGCCGATAATTATACA
DERPac40 GTTGCCCTGTTACTATTAAATGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA
DERPac41 GTTGCCCTGTTACTATTAAATGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA
DERPac43 GTTGCCCTGTTACTATTAAATGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA
DERPac50 GTTGCCCTGTTACTATTAAATGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA
DERasin3 GTTGCCCTGTTACTATTAAATGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA
RHIsin3  GTTGCCCTGTTACTATTACTGCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA
Clustal  ***** ** *****

```

```

          510          520          530          540          550          560          570          580          590          600
EDPac13  GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTA
RHIPac6  GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGCAATATAAATGGAGGAG
RHIPac51 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGCAATATAAATGGAGGAG
RHIPac52 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCMCTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGCAATATAAATGGAGGAG
DERPac1  GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGTAACCCCGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAGATG-----
DERPac40 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATAA
DERPac41 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAAATGGAGGAG
DERPac42 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAAATGGAGGAG
DERPac43 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAAATGGAGGAG
DERPac50 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAAATGGAGGAG
DERasin3 GGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGCAGCCCCGGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAAATGGAGGAG
RHIsin3  GGTTTAGGAAATATAACTTTAGGGGAGCGAATGCTGCACTAATTATACAATCTGTAACCCCGCAAAGATAACACTTGCAGGAAATATAGATGGAGGAG
Clustal  ***** ***** **

```

```

          610          620          630          640
EDPac13  -----
RHIPac6  GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAAC-----
RHIPac51 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAAC-----
RHIPac52 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAAC-----
DERPac1  -----
DERPac40 -----
DERPac41 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAACA-----
DERPac42 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAACA-----
DERPac43 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAACAAAA
DERPac50 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTG-----
DERasin3 GTATAATAACTGTC AAGACAGATGCTGCCATTAAACGGAACA-----
RHIsin3  GTATAATAACTGTC AATACAGATGCTGCCATTAAACGGAAC-----
Clustal  -----

```


410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
RHIPac51 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
RHIPac52 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac1 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac26 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAA - CTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac33 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAA - CTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac35 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAA - CTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAA -----
DERPac37 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAA - CTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac44 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAA - CTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac48 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAA - CTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERasin2 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGG ----
DERasin4 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAACGTAATTTAGGTGGTT
HYAasin8 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCCAAAAC -----
DERPac38 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac30 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAA -----
DERPac40 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac41 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac42 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac43 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac46 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERPac50 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
DERasin1 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTA -----
DERasin3 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
RHiasin2 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCACTGAC -----
HYAasin1 GCTGTGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
HYAasin2 GCTGTGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
HYAasin3 GCTGTGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGTTATATGGCCAAAAC -----
HYAasin4 GCTGTGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTG -----
HYAasin6 GCTGTGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGTTATATGGCCAAAAC -----
HYAasin5 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC AAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGTT
HYAasin7 GCTGCGGTTGCTGCAGGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGTTATATGGCCAAAAC -----

510
.....|.....|
RHIPac51 TAGCTGGTTATAAAGC
RHIPac52 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac1 TAGCTGGTT-----
DERPac26 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac33 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac35 -----
DERPac37 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac44 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac48 TAGCTGGTTATAAAGC
DERasin2 -----
DERasin4 T-----
HYAasin8 -----
DERPac38 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac30 -----
DERPac40 TAGCTGGT-----
DERPac41 TAGCTG-----
DERPac42 TAGCTG-----
DERPac43 TAGCTGGTTATAAAGC
DERPac46 TA-----
DERPac50 TAGCTGG-----
DERasin1 -----
DERasin3 TAGCTGGTTATAAAGC
RHiasin2 -----
HYAasin1 TAGCTGGTTATAAAGC
HYAasin2 TAGCTGGTTATAAAGC
HYAasin3 -----
HYAasin4 -----
HYAasin6 -----
HYAasin5 -----
HYAasin7 -----


```

      410      420      430      440
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
EDPac6  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
SPac6   GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
EDPac7  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
ERPac7  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
SPac7   GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
EDPac8  -----
ERPac9  -----
SPac10  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
EDPac11 -----
SPac11  -----
PLPac16 AGTGTTCATGTCGGTTTC-----
ERPac26 -----
ERPac28 -----
RHIPac6 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
RHIPac51 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
RHIPac52 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
ERPac1  GGTGACAAAG-----
DERPac1 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac26 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac28 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac33 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTA-----
DERPac34 -----
DERPac35 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac36 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACCA-
DERPac37 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac38 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTA-----
DERPac44 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac47 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac48 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERasin2 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC-----
DERasin4 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
HYAasin8 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
EDPac3  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
CLPac3  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
ERPac17 GGTGACGAGGCTGTTGATAATTT-----
EDPac18 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
ERPac18 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACCA
PLPac18 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACCA
EDPac19 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACCA-
EDPac20 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
EDPac21 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
ERPac21 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
EDPac2  GGTGACGAAGGCTTAAAG-----
BPac12  -----
SPac21  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACCA
EDPac27 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
CLPac27 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac30 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTA-----
DERPac31 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACCA
DERPac32 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGG CCAAACC-
DERPac40 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac41 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTA-----
DERPac42 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGC-----
DERPac43 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac46 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERPac50 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
DERasin1 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAG-----
DERasin3 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
RHIasin4 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
BPac22  GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAAC-
RHIasin1 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
RHIasin2 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCAAAAACC--
RHIasin6 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
CLPac24 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
ERPac24 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
EDPac25 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
CLPac25 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
ERPac25 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
RHIasin5 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
HYAasin5 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTACGGTATATGGGCCAAAACC--
HYAasin7 GGTGACGAAGCTGTTGACCAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
BPac29  GGTGACGAGGCTGGG-----
HYAasin1 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGG-----
HYAasin2 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTACGGTATATGGCAAAAACC--
HYAasin3 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--
HYAasin4 GGTGACGAGGCTG-----
HYAasin6 GGTGACGAGGCTGTTGATAATGTAGCTTATGGTATATGGGCCAAAACC--

```



```

          310          320          330          340
EDPac6   TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
SPac6    TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
ERPac16  TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
PLPac16  TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
SPac16   TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
RHIpac6  TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCA----
RHIpac51 TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
RHIpac52 TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCA----
HYAasin4 TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
EDPac2   TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAGCA--
SPac10   TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
EDPac15  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
EDPac19  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
EDPac20  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
EDPac23  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
ERPac24  CTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
EDPac25  CTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
ERPac25  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
BPac12   TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
EDPac18  TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
SPac29   TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
ERPac14  TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
ERPac17  TTTATTGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
PLPac18  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
SPac18   TTTATTCGG-----
DERPac30 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----
DERPac31 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGAA-----
DERPac32 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTAT-----
DERPac40 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----
DERPac41 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----
DERPac42 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----
DERPac43 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
DERPac46 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
DERPac50 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----
DERasin1 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
DERasin3 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGG-----
ERPac18  TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
DERPac37 -----
DERasin4 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
HYAasin3 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
HYAasin5 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAA----
HYAasin6 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCG-----
BPac22   TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
RHIasin1 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
RHIasin2 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAATGT
RHIasin3 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCA----
DERPac28 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
DERPac36 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
DERPac38 TTTATTC-----
DERPac39 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
DERPac45 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC-----
DERPac47 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAACA--
HYAasin1 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----
HYAasin2 TTTATTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGG-----

```



```

          310          320          330          340          350          360          370          380          390          400
DERasin4  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCCT
HYAasin5  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
RHIpac6   ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
RHIpac52  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
RHIpac51  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac43  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERasin3  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac32  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac46  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac50  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
HYAasin1  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
HYAasin2  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERasin1  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac30  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac31  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac40  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac41  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac42  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
RHIasin2  ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
DERpac35  ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTGGCAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCAATACCGAGTGAGTGAAGGCC
Clustal  *****

```

```

          410          420          430          440
DERasin4  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTT-----
HYAasin5  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTA---
RHIpac6   TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTA---
RHIpac52  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
RHIpac51  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERpac43  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERasin3  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERpac32  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTT---
DERpac46  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTACTGA-
DERpac50  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGAT-----
HYAasin1  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTATA---
HYAasin2  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERasin1  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTAAA---
DERpac30  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTAAA---
DERpac31  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERpac40  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERpac41  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGT-TA---
DERpac42  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTTA---
RHIasin2  TAGGGTTGTAAGCTCTTTAGCAAGGAAGATAATGACGTTAA---
DERpac35  TCGGGTTGTAAGCTCTTCA-----
Clustal  * *****

```