

Detección de “*Candidatus Rickettsia andeanae*” en *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) en Rapa Nui-Isla de Pascua

Detection of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” in *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) from Rapa Nui-Easter Island

Ignacio Troncoso-Toro^{1,2}, Sebastián Muñoz-Lea³, Michele Thompson³, Jaime Salinas⁴, Elizabeth Varas⁴ y Daniel González-Acuña^{1,3}.

¹Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Universidad de las Américas, Concepción, Chile.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Pedro de Valdivia, Chillán.

³Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán (Ñuble), Chile.

⁴Sociedad de Infectología Veterinaria (INFECVET).

El trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT no. 1170972.

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses financieros o personales que puedan sesgar el estudio.

Recibido: 13 de febrero de 2020 (segunda versión: 17 de junio de 2021) / Aceptado: 22 de junio de 2021

Resumen

Introducción: Las rickettsiosis son enfermedades emergentes transmitidas por vectores artrópodos cuyos agentes etiológicos corresponden a bacterias patógenas del género *Rickettsia* y *Orientia*. Bacterias de este género han sido descritas en el norte y sur de Chile. **Objetivo:** Determinar presencia de *Rickettsia* spp. en garrapatas coleccionadas a partir de perros domésticos en Rapa Nui-Isla de Pascua, Región de Valparaíso. **Métodos:** Fueron muestreados 20 perros callejeros durante octubre del año 2018. Se colectaron ocho garrapatas adultas desde siete animales (prevalencia: 35%); luego de su identificación taxonómica fueron sometidas a amplificación y secuenciación del gen ADNm 16S para garrapata y *gltA* (citrate sintetasa) para *Rickettsia*. **Resultados:** Todos los ejemplares de garrapatas adultas correspondieron genéticamente a *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto lo cual fue confirmado mediante un análisis filogenético. En dos garrapatas (25%) se encontraron secuencias idénticas de *gltA* compatibles con “*Candidatus Rickettsia andeanae*”, que formaron un clado monofilético con aislados obtenidos en Brasil, Chile y Perú. **Conclusiones:** Se documenta la presencia de “*Ca. R. andeanae*” s. s. en Rapa Nui-Isla de Pascua, asociado por primera vez a garrapatas del complejo *R. sanguineus* en Chile.

Palabras clave: garrapatas duras; Chile; Rapa Nui-Isla de Pascua; rickettsiosis; garrapata café; perro.

Abstract

Background: Rickettsioses are vector-borne emerging diseases caused by pathogenic bacteria of the genera *Rickettsia* and *Orientia*. Bacteria of these genera have been described in northern and southern Chile, respectively. **Aim:** To determine the presence of *Rickettsia* spp. in ticks collected from domestic dog in Rapa Nui-Easter Island, Valparaíso Region. **Methods:** 20 stray dogs were sampled during October 2018. Overall, eight adult ticks were collected from seven animals (prevalence: 35%); after morphological identification, were submitted to DNA extraction and amplification and sequencing of the tick mitochondrial 16S DNA gene. The screening for *Rickettsia* was performed targeting the *gltA* (citrate synthetase) gene. **Results:** A phylogenetic analysis confirmed the identity of the ticks as *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto. In two ticks (25%), we retrieved identical sequences of *gltA* compatible with “*Candidatus Rickettsia andeanae*”, which formed a monophyletic group with conspecific isolates obtained in Brazil, Chile and Peru. **Conclusions:** This study proves the presence of “*Ca. R. andeanae*” in *R. sanguineus* s. s. at Rapa Nui-Easter Island, which also corresponds to the first report of this *Rickettsia* spp. in *R. sanguineus* complex for Chile.

Keywords: hard tick; Chile; Rapa Nui-Easter Island; rickettsiosis; brown tick; dog.

Correspondencia a:

Ignacio Troncoso-Toro
ignacio.troncoso@edu.udla.cl

Introducción

Las rickettsiosis son enfermedades infecciosas de carácter zoonótico, causadas por bacterias patógenas del género *Rickettsia* y *Orientia*, transmitidas al hombre a través de artrópodos vectores como garrapatas, pulgas, piojos y ácaros¹. Actualmente son reconocidas mundialmente como enfermedades emergentes o re-emergentes² y su epidemiología se encuentra estrechamente relacionada con la presencia del vector específico². Hasta hace pocos años, *Rickettsia rickettsii* era el único patógeno rickettsial transmitido por garrapatas en América; sin embargo, el avance de los métodos de diagnóstico molecular ha permitido describir nuevas especies en las últimas décadas, como es el caso de *Rickettsia parkeri*³. Aunque para algunas especies de *Rickettsia* su patogenicidad aún no ha sido confirmada, las bacterias de este género pueden ser consideradas como potenciales patógenos³.

En Chile, se han identificado a la fecha tres agentes rickettsiales: *Rickettsia felis*, en pulgas de gato *Ctenocephalides felis* y *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.)^{4,5}; “*Candidatus Rickettsia andeanae*” detectada en garrapatas del género *Amblyomma* (i. e. *Amblyomma tigrinum* y *Amblyomma triste*), agente del que aún se desconoce su rol patógeno para las personas o mascotas^{6,7} y “*Candidatus Orientia chiloensis*”⁸ relacionada con larvas de ácaros de la familia *Trombiculidae* encontrada en roedores y lesiones de personas del sur de Chile, Chiloé y Chile continental⁹.

Dieciséis especies de garrapatas duras (Ixodidae) pertenecientes a tres géneros (*Amblyomma*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*) han sido descritas para Chile; tres de éstas parasitan a caninos domésticos: *R. sanguineus* s.l., *A. tigrinum* y *A. triste*. Debido a su relevancia económica, de salud pública y distribución, la mayoría de los trabajos a nivel mundial se enfocan en especies del grupo *R. sanguineus* s.l.^{10,11}, cuya distribución geográfica abarca de los 50° latitud norte hasta los 35° latitud sur¹².

En América, *R. sanguineus* s.l. está conformada por al menos dos linajes con distinta distribución biogeográfica y posiblemente distinta competencia vectorial¹³. El linaje tropical se encuentra relacionado filogenéticamente con garrapatas de África, mientras que, el linaje templado (*R. sanguineus* sensu stricto [s.s.]), que se distribuye en localidades templadas de Argentina, Chile y Uruguay, se relaciona con garrapatas del oeste de Europa¹⁴⁻¹⁶.

En Chile, este complejo de especies se distribuye desde Arica en el extremo norte (18° 29' 01" S) hasta Valdivia en el sur (39° 49' 11" S)^{17,18}, siendo el último antecedente a nivel nacional documentado por Oyarzún-Ruiz y cols., (2021) que demostró su presencia en Osorno (Región de los Lagos)¹⁹. Anteriormente, Díaz y cols., (2018), demostraron una distribución más amplia para el linaje tropical,

abarcando hasta la latitud 22°S en Chile (Argentina, 23°S; Paraguay, 25°S; Brasil, 28°S). Estos autores establecen el límite norte del linaje templado en Chile en la latitud 20°S y sugieren que las distribuciones de los linajes tropical y templado se superponen, formando una zona de transición de aproximadamente 200 km en la costa norte de Chile (desde Iquique en la Región de Tarapacá, hasta Tocopilla en la Región de Antofagasta)²⁰. Además, *R. sanguineus* s.l. se ha registrado en San Juan Bautista, en la Isla Robinson Crusoe²¹ y en Rapa Nui-Isla de Pascua²².

Rhipicephalus sanguineus s.l. puede ser portador de diversos patógenos bacterianos y parasitarios como *Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* y *Rickettsia* spp.^{23,24}.

Basado en los antecedentes de la presencia de garrapatas del complejo *R. sanguineus* s.l. en Chile insular, y hallazgos moleculares de *Bartonella* y *Rickettsia* en pulgas en Rapa Nui-Isla de Pascua²⁵, nuestro objetivo fue evaluar la presencia de bacterias del género *Rickettsia* en garrapatas de caninos de Rapa Nui-Isla de Pascua, Región de Valparaíso.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Rapa Nui-Isla de Pascua se encuentra en el extremo este del territorio polinésico, en el Océano Pacífico (27°09'30" S de latitud y 109°24'14" W de longitud) y forma parte del territorio nacional de Chile. Posee un clima marítimo templado cálido con un rango de temperatura mensual promedio de aproximadamente 5°C, con mínimas en julio-septiembre (aproximadamente 18°C) y máximas en enero-marzo (aproximadamente 23°C)²⁶. Según registros del año 2017, la isla tiene alrededor de 7.750 residentes y los caninos criados en libertad son frecuentes²⁷. Basado en registros de la Subdere (Subsecretaría de Desarrollo Regional y Administrativo) para los años 2017–2018, se estima una población de 3.200 perros con propietario en Hanga Roa (único poblado de la isla) de los cuales 81% recibe atención municipal gratuita.

Colecta de garrapatas

El muestreo de tipo dirigido se realizó durante el mes de octubre de 2018, en Hanga Roa, Rapa Nui-Isla de Pascua, donde se obtuvieron ocho garrapatas (cinco machos y tres hembras) de siete caninos sin supervisión, de un total de 20 animales sin raza definida deambulando por las calles. Las garrapatas fueron extraídas de forma manual^{28,29}, para luego ser transportadas en alcohol al 96% y almacenadas en el Laboratorio de Parásitos y Enfermedades de Fauna Silvestre la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Análisis morfológicos

Las garrapatas fueron separadas por estadio utilizando una lupa y se identificaron a nivel de especie por medio de descripciones publicadas^{10,30}.

Diagnóstico molecular

Se realizó extracción de ADN a cada espécimen colectado utilizando la técnica de isotiocianato de guanidina y fenol cloroformo³¹. Para confirmar las extracciones y además identificar genéticamente a las garrapatas, se realizó una reacción de polimerasa en cadena (RPC) convencional, donde se amplificó un fragmento parcial (≈ 460 pares de bases [pb]) del gen ARNr de 16S mitocondrial siguiendo un protocolo establecido³². Para detectar ADN de *Rickettsia* se utilizaron los partidores CS-78 y CS-323 diseñados para anillar con un fragmento conservado de 401 pb del gen codificante para citrato sintetasa (*gltA*), presente en todas las especies de *Rickettsia*³³. Las muestras positivas fueron secuenciadas en ambas direcciones, editadas en el software Geneious R9³⁴ y posteriormente comparadas con la base de datos GenBank utilizando BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Análisis filogenéticos

Dos alineamientos fueron construidos con MAFFT³⁵, uno para secuencias del gen ARNr de 16S mitocondrial y otro para *gltA*. Las relaciones filogenéticas se evaluaron con el método de máxima verosimilitud aproximada utilizando FastTree³⁶. Se construyeron dos árboles utilizando el modelo generalizado de tiempo reversible (GTR por sus siglas en inglés) con cinco categorías de sitios, optimizando el análisis para verosimilitud Gamma20. Las secuencias de *Rhipicephalus decoloratus* (EU918193), *Rhipicephalus annulatus* (L34311), *Rhipicephalus microplus* (EU918176) y *Rickettsia canadensis* Mickel (CP000409) fueron utilizadas grupo externo en ambos árboles.

Resultados

Mediante los análisis morfológicos y empleando BLASTn confirmamos el segundo registro *R. sanguineus* en la isla, ya que las secuencias de ADN de 16S mitocondrial obtenidas para las ocho garrapatas de Rapa Nui-Isla de Pascua fueron 99% (379 pb) idénticas a *R. sanguineus* de Estados Unidos de América (MH018852). El análisis filogenético confirmó que las garrapatas colectadas en Rapa Nui-Isla de Pascua corresponden al linaje templado de esta especie, es decir a *R. sanguineus* s.s. (Figura 1).

En dos garrapatas (macho y hembra) se logró amplificar el gen *gltA* para *Rickettsia* (25%) y las secuencias

obtenidas fueron 100% (350/350 pb) idénticas a una secuencia de “*Ca. R. andeanae*” obtenida de *Amblyomma parvum* en Brasil (KY402176). Los haplotipos de “*Ca. R. andeanae*” recuperados de *R. sanguineus* s.s. de Rapa Nui-Isla de Pascua forman un clado con secuencias de “*Ca. R. andeanae*” obtenidas de *Ixodes boliviensis* (Perú), *A. parvum* (Brasil) y *A. triste* (Chile) (Figura 2). Las secuencias generadas en este estudio fueron depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso MZ393412 (*R. sanguineus* s.s.) y MZ398137 (“*Ca. R. andeanae*”).

Discusión

Los ejemplares de *R. sanguineus* colectados fueron identificados genéticamente y corresponden al linaje templado de esta garrapata, coincidente con el único antecedente publicado²¹, donde se registró en Rapa Nui-Isla de Pascua, una garrapata con el haplotipo D de *R. sanguineus*, también registrado en la zona sur de Chile. De este modo, es probable que la presencia de esta garrapata en la isla tuvo su origen en especímenes transportados desde Chile continental.

Este estudio reporta la presencia de “*Ca. R. andeanae*” en *R. sanguineus* s.s. en Rapa Nui-Isla de Pascua. Esta bacteria pertenece al grupo etiológico de las fiebres manchadas³⁷ y fue descrita por primera vez en América del Sur en 2004 en *A. maculatum* e *Ixodes boliviensis* en Perú^{37,39}. Posteriormente, fue reportada en *A. parvum* y *Amblyomma pseudoconcolor* en Argentina^{40,41,42} y en *A. parvum* de Brasil⁴³. En particular, “*Ca. R. andeanae*” fue el primer agente rickettsial identificado en garrapatas del género *Amblyomma* en Chile, específicamente en *A. triste* en la Región de Arica-Parinacota⁶ y además en *A. tigrinum* en las regiones de Coquimbo y La Araucanía⁷.

En este estudio se detectó *Ca. R. andeanae* en dos de ocho especímenes analizados (25%) de *R. sanguineus* s.s., siendo éste el segundo reporte de bacterias del género *Rickettsia* en este complejo de especies de garrapatas en Chile, posterior al hallazgo de *R. felis* en la Región Metropolitana en Santiago, y en localidades urbanas y rurales de Arica, realizado por Abarca y cols., en el año 2013⁵. En este mismo estudio *R. sanguineus* s.l. colectados en la Región de Coquimbo y en Angol (Región de la Araucanía) resultaron negativos para “*Ca. R. andeanae*”.

El único antecedente a nivel mundial de “*Ca. R. andeanae*” en *R. sanguineus*, fue reportado por Flores-Mendoza y cols., quienes detectaron esta bacteria en dos garrapatas obtenidas de perros en Perú⁴⁴. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio representarían el segundo reporte a nivel mundial y el primero para Chile.

Aun cuando “*Ca. R. andeanae*” ha sido cultivada en

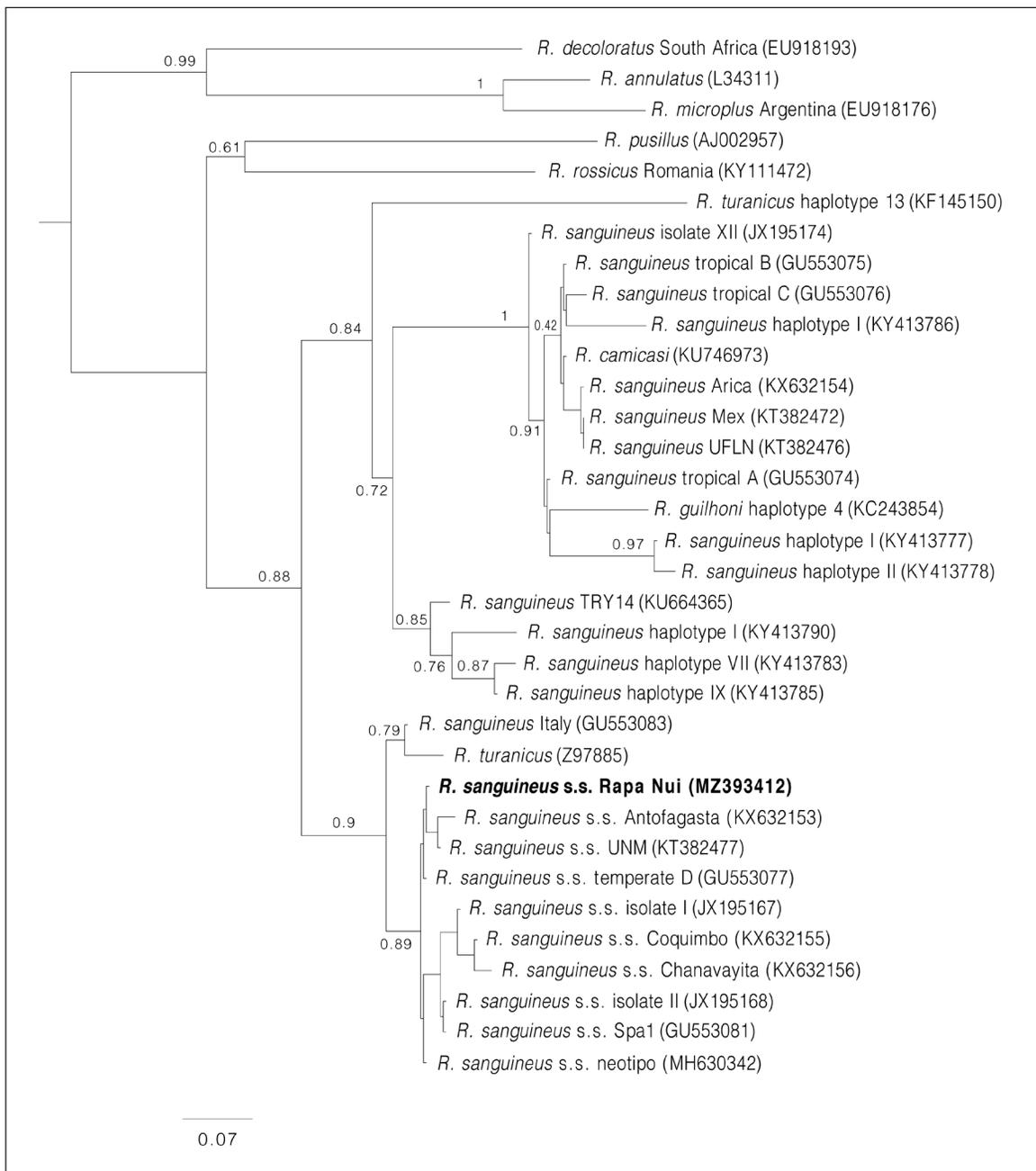


Figura 1. Árbol filogenético inferido para un fragmento parcial del gen ARNr de 16S mitocondrial para un subgrupo de garrapatas del género *Rhipicephalus*. Los valores de soporte se indican sobre o bajo las principales ramas del árbol. La secuencia generada en este estudio se encuentra marcada en negrita.

líneas celulares de mamíferos⁴⁵ su rol como patógeno en humanos y animales es aún desconocido. Sin embargo, es importante mencionar que varias especies de *Rickettsia* inicialmente consideradas como apatógenas fueron documentadas posteriormente como virulentas en humanos⁴⁶. Por ello, toda especie de *Rickettsia* encontrada en un

hospedero invertebrado debe considerarse *a priori* como potencialmente patógena.

Agradecimientos. El trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT no. 1170972. ITT contó con el apoyo de la Beca de Doctorado Nacional de CONICYT # 21161478.

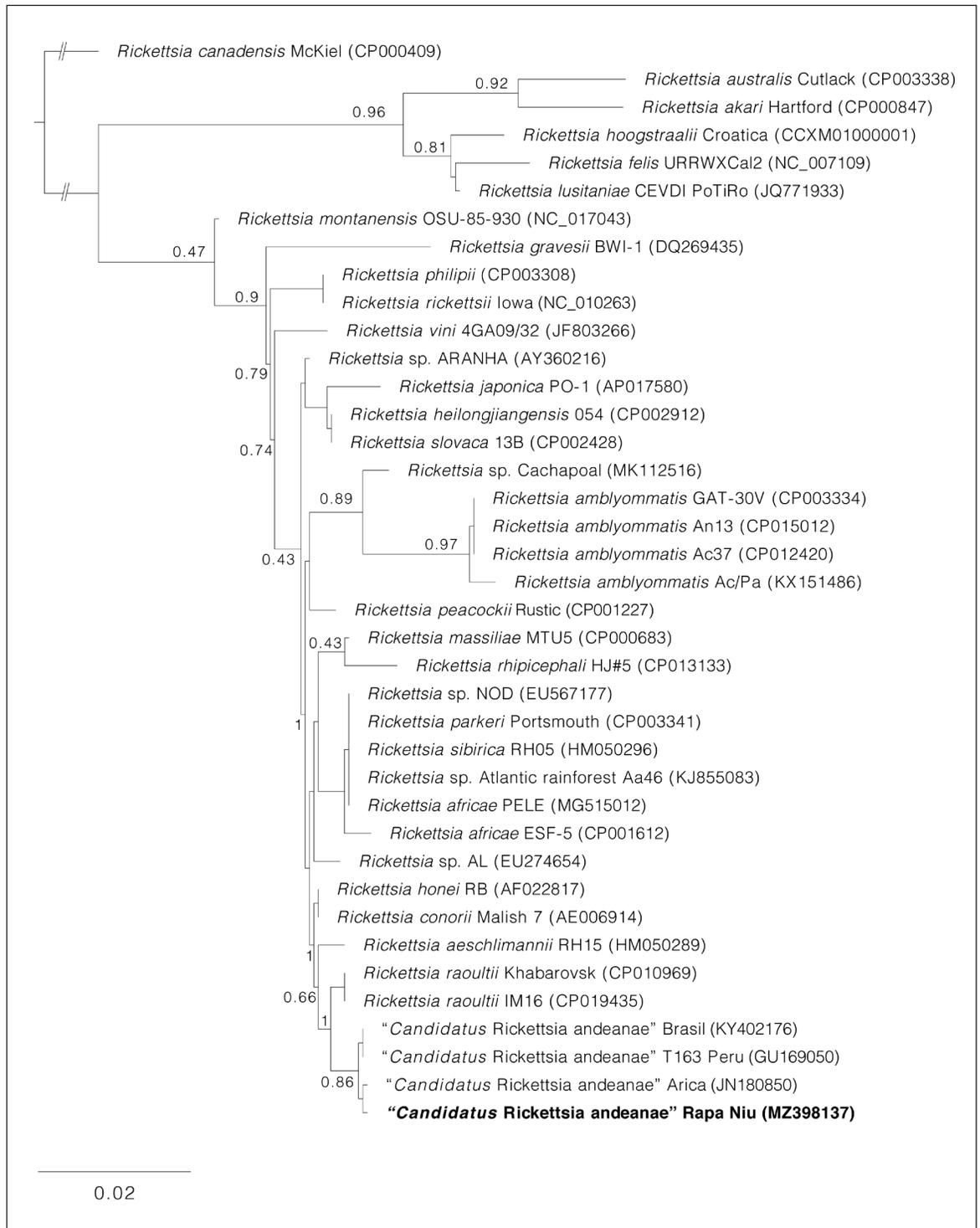


Figura 2. Árbol filogenético inferido para un fragmento parcial del gen *gltA* de *Rickettsia*. Los valores de soporte se indican sobre o bajo las principales ramas del árbol. La secuencia generada en este estudio se encuentra marcada en negrita.

Referencias bibliográficas

- 1.- Renvoisé A, Raoult D. An update on rickettsiosis. *Med Mal Infect* 2009; 39(2): 71-81. doi: 10.1016/j.medmal.2008.11.003.
- 2.- Merhej V, Angelakis E, Socolovschi C, Raoult D. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infect Genet Evol* 2014; 25:122-37. doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.014.
- 3.- Parola P, Paddock C D, Socolovschi C, Labruna M B, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4): 657-702. doi: 10.1128/CMR.00032-13.
- 4.- Labruna M B, Ogrzewalska M, Moraes-Filho J, Lepe P, Gallegos J L, López J. *Rickettsia felis* in Chile. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(11): 1794-5. doi: 10.3201/eid1311.070782.
- 5.- Abarca K, López J, Acosta-Jamett G, Martínez-Valdebenito C. *Rickettsia felis* in *Rhipicephalus sanguineus* from two distant Chilean cities. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13(8): 607-9. doi: 10.1089/vbz.2012.1201.
- 6.- Abarca K, López J, Acosta-Jamett G, Lepe P, Soares J F, Labruna M B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile. *J Med Entomol* 2012; 49(1): 219-22. doi: 10.1603/me11147.
- 7.- Abarca K, López J, Acosta-Jamett G, Martínez-Valdebenito C. Identificación de *Rickettsia andeanae* en dos regiones de Chile. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30(4): 388-94. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n4/art06.pdf>.
- 8.- Abarca K, Martínez-Valdebenito C, Ángulo J, Jiang J, Farris C M, Richards A L, et al. Molecular description of a novel *Orientia* species causing scrub typhus in Chile. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(9): 2148-56. doi: 10.3201/eid2609.200918.
- 9.- Acosta-Jamett G, Beltrami E, de La Fuente M C S, Martínez-Valdebenito C, Weitzel T, Abarca K. First identification of trombiculid mites (Acari: Trombiculidae) on rodents captured on Chiloé island, an endemic region of scrub typhus in southern Chile. *PLOS Negl Trop Dis*. 14(1): e0007619. doi: 10.1371/journal.pntd.0007619.
- 10.- Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna M B, Szabó M P, Guglielmo A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) *Vet Parasitol* 2015; 208(1-2): 2-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.021.
- 11.- Hekimoğlu O, Sağlam İ K, Özer N, Estrada-Peña A. New molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Ticks. Tick-Borne Dis* 2016; 7(5): 798-807. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.014.
- 12.- Ramírez Hernández A. Identificación molecular y análisis de la relación filogenética de especies de rickettsias presentes en garrapatas provenientes de tres regiones de Colombia (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia). 2014. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21796/5598861.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- 13.- Moraes-Filho J, Krawczak F S, Costa F B, Soares J F, Labruna M B. Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS One* 2015; 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139386>.
- 14.- Nava S, Mastropaolo M, Venzal J M, Mangold A J, Guglielmo A A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol* 2012; 190 (3-4): 547-55. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.032.
- 15.- Chitimia-Dobler L, Langguth J, Pfeffer M, Kattner S, Küpper T, Friese D, Nava S. Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences. *Vet Parasitol* 2017; 239: 1-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.012.
- 16.- Dantas-Torres F, Maia C, Latrofa M S, Annoscia G, Otranto D. Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasit Vectors* 2017; 10: 133. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2072>.
- 17.- López Del J, Abarca K, Azócar T. Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24(3): 189-93. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182007000300002>.
- 18.- Abarca K, Gárate D, López J, Acosta-Jamett G. Pulgas y garrapatas en perros urbanos y rurales en cuatro regiones en Chile. *Arch Med Vet* 2016; 48(2): 247-53. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2016000200017>.
- 19.- Oyarzún-Ruiz P, Espinoza-Carniglia M, Reidembach S, Muñoz P, Moreno L. Expansion in the latitudinal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) to southern Chile. *Exp Applied Acarol* 2021; 83(1): 107-14. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00577-0>.
- 20.- Díaz F E, Martínez-Valdebenito C, López J, Weitzel T, Abarca K. Geographical distribution and phylogenetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato in northern and central Chile. *Ticks Tick-Borne Dis* 2018; 9(4): 792-7. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.004>.
- 21.- González-Acuña D, Moreno L, Hermosilla C. Parásitos en perros de San Juan Bautista, Isla Robinson Crusoe, Chile. *Arch Med Vet* 2008; 40(2): 193-5. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2008000200012>.
- 22.- Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos F A, Richtzenhain L J, Labruna M B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop*. 2011; 117(1): 51-5. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.09.006.
- 23.- Dantas-Torres, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors* 2008; 1(1): 25. doi: 10.1186/1756-3305-1-25.
- 24.- Dantas-Torres F, Otranto D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet Parasitol* 2015; 208 (1-2): 9-13. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.014.
- 25.- Cevidanes A, Di Cataldo S, Vera F, Lillo P, Millán J. Molecular detection of vector-borne pathogens in rural dogs and associated *Ctenocephalides felis* Fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Easter Island (Chile). *J Med Entomol* 2018; 55(6): 1659-63. doi: 10.1093/jme/tjy141.
- 26.- Herrera C, Custodio E. Conceptual hydrogeological model of volcanic Easter Island (Chile) after chemical and isotopic surveys. *Hydrogeol J* 2008; 16(7): 1329-48. <https://doi.org/10.1007/s10040-008-0316-z>.
- 27.- Flores M, Lazo P, Campbell G, Simeone A. Breeding status of the red-tailed tropicbird (*Phaethon rubricauda*) and threats to its conservation on Easter Island (Rapa Nui). *Pacific Science* 2017; 71(2): 149-60. doi:10.2984/71.2.4.
- 28.- Vassallo M, Paul R E L, Pérez-Eid C. Temporal distribution of the annual nymphal stock of *Ixodes ricinus* ticks. *Exp Appl Acarol* 2000; 24(12): 941-9. doi: 10.1023/a:1010669003887.
- 29.- Barker S C, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 2004; 129(S1): S15-S36. doi: 10.1017/s0031182004005207.
- 30.- Nava S, Venzal J M, González-Acuña D, Martins T F, Guglielmo A A. Ticks of the Southern Cone of America. 2017. 1st edition. Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Academic Press. Pp. 372.
- 31.- Sangioni L A, Horta M C, Vianna M C, Gennari S M, Soares R M, Galvão M A, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(2): 265-70. doi: 10.3201/eid1102.040656.
- 32.- Mangold A J, Bargues M D, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 1998; 84(6): 478-84. doi: 10.1007/s004360050433.
- 33.- Labruna M B, Whitworth T, Horta M C, Bouyer D H, McBride J W, Pinter A, et al. *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* 2004; 42(1): 90-8. doi: 10.1128/JCM.42.1.90-98.2004.
- 34.- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647-9. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- 35.- Katoh K, Misawa K, Kima K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 3059-66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- 36.- Price M N, Dehal P S, Arkin A P, FastTree 2-Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 2010; 5: e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.
- 37.- Jiang J, Blair P J, Felices V, Moron C, Cespedes M, Anaya E, et al. Phylogenetic analysis of a novel molecular isolate of spotted fever group rickettsiae from northern Peru. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1063: 337-42. doi: 10.1196/annals.1355.054.
- 38.- Paddock C D, Denison A M, Dryden M W, Noden B H, Lash R R, Abdelghani S S, et al. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” and apparent exclusion of *Rickettsia parkeri* in adult *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) from Kansas and Oklahoma. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6(3): 297-302. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.02.001.
- 39.- Jiang J, Stromdahl E Y, Richards A L. Detection of *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma maculatum* Gulf Coast ticks collected from humans in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(3): 175-82. doi: 10.1089/vbz.2011.0614.
- 40.- Pacheco R C, Moraes-Filho J, Nava S, Brandão P E, Richtzenhain L J, Labruna M B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Exp Appl Acarol* 2007; 43(1): 63-71. doi: 10.1007/s10493-007-9099-5.
- 41.- Tomassone L, Nuñez P, Ceballos L A, Gürtler R E, Kitron U, Farber M. Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. strain Argentina” and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from northern Argentina. *Exp Appl Acarol* 2010; 52(1): 93-100. doi: 10.1007/s10493-010-9339-y.
- 42.- Monje L D, Fernández C, Percara A. Detection of *Ehrlichia* sp. strain San Luis and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma parvum* ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 2019; 10(1): 111-4. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.09.008.
- 43.- Nieri-Bastos F A, Lopes M G, Cançado P H D, Rossa G A R, Faccini J L H, Gennari S M, et al. *Candidatus Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109(2): 259-61. doi: 10.1590/0074-0276140283.
- 44.- Flores-Mendoza C, Florin D, Felices V, Pozo E J, Graf P C, Burrus R G, et al. Detection of *Rickettsia parkeri* from within Piura, Peru, and the first reported presence of *Candidatus Rickettsia andeanae* in the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013; 13(7): 505-8. doi: 10.1089/vbz.2012.1028.
- 45.- Luce-Fedrow A, Wright C, Gaff H D, Sonenshine D E, Hynes W L, Richards A L. In vitro propagation of *Candidatus Rickettsia andeanae* isolated from *Amblyomma maculatum*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 64(1): 74-81. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00905.x.