



Parasitismo de *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) en humanos y determinación molecular de organismos rickettsiales y piroplasmas en el norte de Uruguay

Amblyomma aureolatum parasitism in humans and molecular determination of Rickettsial organisms and piroplasms in northern Uruguay

Alvez R.,¹ Félix M.L.,¹ Queirolo D.,² Venzal J.M.,^{1*}

¹ Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República. Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay.

² Ecología de Vertebrados, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República.

*Correspondencia: José M Venzal. E-mail: jvenzal@unorte.edu.uy

Recibido 09/08/2023 – Aceptado 30/10/2023

Resumen: *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) se distribuye en Sudamérica y posee importancia médica y veterinaria. En Uruguay se encuentra ampliamente distribuida parasitando vertebrados silvestres y domésticos y se la relaciona a casos de rangeliosis canina. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de organismos rickettsiales y piroplasmas en *A. aureolatum* del norte de Uruguay. Para ello se recolectaron 117 ninfas y adultos de *A. aureolatum* sobre zorros, perros y vegetación, así como una sobre un humano. Se extrajo ADN de las garrapatas obtenidas de animales y vegetación para realizar diferentes PCR utilizando cebadores dirigidos a genes para la detección de ADN de organismos Rickettsiales (*Anaplasmataceae*, *Rickettsiaceae* y *Midichloriaceae*) así como protozoarios del Orden Piroplasmida. Como resultados se obtuvieron tres secuencias, una para el gen *gltA* con una identidad de entre 99,4 a 100% con *Rickettsia bellii*, otra para el gen 16S ARNr con un 100% de identidad con *Candidatus* *Midichloria* sp. y la restante con 100% de identidad con *Rangelia vitalii* para el gen 18S ARNr. Estos resultados corresponden a los primeros reportes de *R. bellii* para el país y de *Ca. Midichloria* sp. y *R. vitalii* en *A. aureolatum*. Además, se reporta el primer caso de *A. aureolatum* parasitando humanos en Uruguay.

Palabras clave: *Amblyomma aureolatum*, *Rickettsia bellii*, *Candidatus* *Midichloria* sp., *Rangelia vitalii*, Uruguay

Summary: *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) is distributed in South America and holds medical and veterinary significance. In Uruguay, it is widely distributed, parasitizing both wild and domestic vertebrates, and has been associated with cases of canine rangeliosis. This studied aimed to determine the presence of rickettsial organisms and piroplasms in *A. aureolatum* from northern Uruguay. A total of 117 nymphs and adults of *A. aureolatum* were collected from foxes, dogs, vegetation, and one specimen was found on a human. DNA was extracted from ticks obtained from animals and vegetation to performing various PCR assays using primers targeting genes to detect DNA from Rickettsial organisms (*Anaplasmataceae*, *Rickettsiaceae*, and *Midichloriaceae*) as well as Piroplasmida protozoa. As a result, three sequences were obtained: one for the *gltA* gene with an identity ranging from 99.4% to 100% with *Rickettsia bellii*, another for the 16S rRNA gene showing 100% identity with *Candidatus* *Midichloria* sp., and the remaining sequence displayed 100% identity with *Rangelia vitalii* for the 18S rRNA gene. These results represent the first reports of *R. bellii* in the country and of *Ca. Midichloria* sp. and *R. vitalii* in *A. aureolatum*. Additionally, the first case of *A. aureolatum* parasitizing a human in Uruguay is reported.

Keywords: *Amblyomma aureolatum*, *Rickettsia bellii*, *Candidatus* *Midichloria* sp., *Rangelia vitalii*, Uruguay



1. Introducción

Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) es una especie de garrapata Neotropical que se distribuye en Argentina, Brasil, Guyana Francesa, Paraguay, Surinam y Uruguay (Nava et al., 2017). Los principales hospedadores para los adultos son mamíferos carnívoros, aunque el rango es amplio e incluye varias especies de otros órdenes de mamíferos, así como el humano. Las formas inmaduras se han reportado en aves, principalmente passeriformes y en mamíferos del orden Rodentia y Didelphimorphia (Nava et al., 2017; Guglielmone et al., 2021).

Es una especie que tiene importancia sanitaria tanto en salud pública como animal por los patógenos que transmite (Nava et al., 2017). En Uruguay se ha reportado en 8 de los 19 departamentos (Artigas, Colonia, Maldonado, Salto, Paysandú, Río Negro, Rocha y Tacuarembó) parasitando animales domésticos y silvestres, aunque no se ha determinado en humanos (Guglielmone et al., 2021; Martins et al., 2014; Rivero et al., 2017).

Si bien es considerada como una garrapata que parasita a humanos en forma esporádica (Guglielmone y Robbins, 2018), es una especie relevante ya que es reconocido vector de las rickettsiosis causadas por *Rickettsia rickettsii* así como de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlántica en Brasil (Pinter et al., 2006; Labruna, 2009; Barbieri et al., 2014).

También ha sido hallada infectada con *Rickettsia bellii* en Brasil y Argentina, aunque se considera a esta especie como no patógena para vertebrados (Pinter et al., 2006; Horta et al., 2007; Parola et al., 2013). Otro rickettsial determinado en *A. aureolatum* de Argentina es *Candidatus* Midichloria sp., el cual es considerado un endosimbionte (Cicuttin et al., 2022).

En animales su mayor importancia es en caninos tanto domésticos como silvestres, siendo el vector de *Rangelia vitalii* (Nava et al., 2017). En perros provoca un grave cuadro hemorrágico y hemolítico conocido como rangeliosis canina (Soares et al., 2011). *R. vitalii* tendría como hospedadores naturales a zorros, y ha sido determinada en diferentes especies de zorros en Brasil (Soares et al., 2014; Fredo et al., 2015; Silveira et al., 2016) y *Cerdocyon thous* en Uruguay (De Lorenzo et al., 2021). Incluso, en *C. thous* de Brasil se han reportado casos clínicos de rangeliosis (Copat et al., 2019; Soares et al., 2014; Souza et al., 2019). En Uruguay la rangeliosis canina fue reportada por primera vez por Sarasúa y Donati. (1976) y posteriormente Rivero et al. (2017) presentan casos asociados a *A. aureolatum*. El objetivo del presente estudio es determinar la presencia de organismos rickettsiales y piroplasmas en *A. aureolatum* así como presentar el primer caso de parasitismo en humanos de esta garrapata para el país.

2. Materiales y métodos

Los muestreos se realizaron entre los meses de junio y octubre de 2016 con una salida de campo adicional en septiembre de 2017 en la región norte de Uruguay, comprendiendo a los departamentos de Salto, Rivera y Tacuarembó. Las garrapatas fueron colectadas sobre la vegetación mediante la técnica de “bandereo o arrastre” pasando un trozo de tela blanca de un metro de ancho por 1,2 de largo, la cual se revisaba cada 5 a 10 metros (Félix et al., 2021). Además, se obtuvieron garrapatas sobre perros en establecimientos rurales, en zorros hallados recientemente atropellados en rutas y sobre un humano durante uno de los muestreos (Tabla 1). Las garrapatas colectadas se conservaron en alcohol 95° y se las identificó siguiendo las claves propuestas por Nava et al. (2017) mediante el uso de una lupa estereoscópica binocular Nikon modelo SMZ 1000 y fotografiadas con una cámara Nikon modelo DS-Fi3 (Nikon Corporation, Tokio, Japón).

Para la extracción de ADN, las ninfas se procesaron enteras y los adultos se cortaron longitudinalmente a la mitad, donde una mitad fue utilizada para la extracción y la otra conservada en alcohol con su correspondiente identificación. Los lotes (pools) para el procesamiento se realizaron en función del estadio y sexo de las garrapatas, y por cada sitio y fecha de muestreo, no superando los 10 ejemplares por lote en ningún caso.

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Para la detección de ADN del género *Rickettsia*, primero se realizó una PCR convencional (PCRc) a modo de tamizaje usando los cebadores CS78 (5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3') y CS323 (5'-GCTTCCT-TAAAATTCAATAAATCAGGAT-3') que amplifican un fragmento corto de 401 pb del gen *gltA*, que codifica la enzima citrato sintasa (presente en todas las rickettsias) (Labruna et al., 2004; Oteo et al., 2014). A las muestras positivas se les realizó otra PCR que amplifica un fragmento de 834 pb del mismo gen utilizando los cebadores

CS-239 (5'-GCTCTTCTCATCTATGGCTATTAT-3') y CS-1069 (5'-CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT-3') (Labruna et al., 2004).

Como complemento, se realizó una PCR para amplificar un fragmento del 532 pb de la proteína de la membrana externa *ompA*, que está presente fundamentalmente en las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, utilizando los cebadores Rr190.70p (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAA-3') y Rr190.602n (5'-AGTGCA-GCATTCGCTCCCCCT-3') (Roux et al., 1996; Oteo et al., 2014).

Para los rickettsiales de la familia *Anaplasmataceae* se empleó una PCR de tamizaje usando los cebadores EHR16SD (5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3') y EHR16SR (5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3') que amplifican un fragmento de 345 pares de bases (pb) del gen *16S ARNr* (Parola et al., 2000). Las muestras positivas fueron sometidas a otras dos PCRs dirigidas al mismo gen que amplifican dos fragmentos solapantes de aproximadamente 1500 pb, utilizando la combinación de cebadores fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') / EHR16SR y EHR16SD / rP2 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991; Inokuma et al., 2001).

Mientras que para piroplasmas, se utilizaron los cebadores BAB143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') y BAB694-667 (5'-GCTTGAAACACTCTARTTTCTCAAAG-3') que amplifican un fragmento de 551 pb del gen *18S ARNr* de los géneros *Babesia*, *Rangelia*, *Theileria* y *Cytauxzoon* (Soares et al., 2017).

Como controles positivos se utilizó *Anaplasma marginale*, *Rickettsia parkeri* y *Babesia bovis* y como control negativo agua de grado molecular libre de nucleasas.

Los productos resultantes de las PCRs se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con GoodView Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co. Ltd., China), y visualizados bajo un transiluminador UV.

Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados utilizando el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lituania) y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas se corrigieron manualmente y se alinearon utilizando el programa MUSCLE en el software MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Las secuencias consensos finales se compararon con otras disponibles en el GenBank.

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias obtenidas y las especies relacionadas se realizaron mediante el software MEGA 7 (Kumar et al., 2016) utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Tamura 3 parámetros (Tamura, 1992).

Resultados

Se recolectaron un total de 118 garrapatas, determinadas como *A. aureolatum*, de las cuales 89 fueron ninfas, 15 machos y 14 hembras. Ciento nueve se obtuvieron de la vegetación (89 ninfas, 13 machos y 7 hembras), seis extraídas de perros (1 macho y 5 hembras), dos obtenidas de dos zorros *C. thous* (1 macho en uno y 1 hembra en otro) y una hembra hallada parasitando a un humano. Los detalles para cada lote obtenido se presentan en la Tabla 1.

La hembra hallada parasitando a un humano en la región interdigital de una mano en Gruta de los Cuervos, departamento de Tacuarembó, corresponde al primer reporte para Uruguay (Figura 1). Este ejemplar, al que no se le realizaron análisis moleculares, fue depositado en la colección del Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas del CENUR Litoral Norte, Universidad de la República bajo el número DPVURU-919.

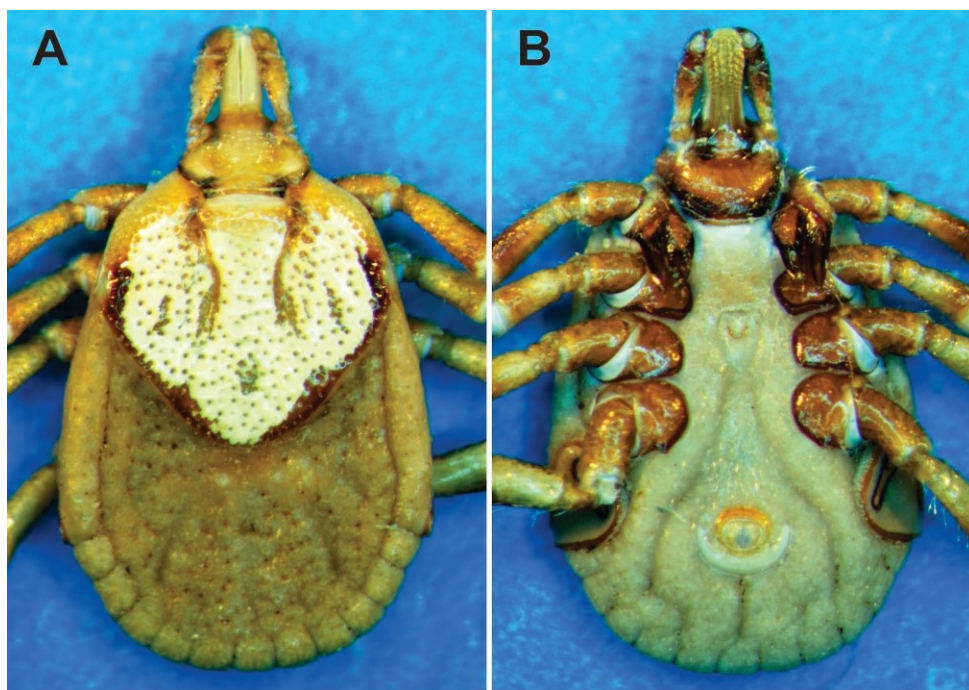


Figura 1. Hembra de *Amblyomma aureolatum* hallada en humano. A) Vista dorsal B) Vista ventral.

En cuanto a los análisis moleculares para la detección del género *Rickettsia*, de las 24 muestras procesadas, siete amplificaron para la PCR de tamizaje dirigida al gen *gltA* (cebadores CS78/CS323). De estas siete muestras, solo una, la A73-2, compuesta por 10 ninfas recolectadas de vegetación en Gruta de los Cuervos, Departamento de Tacuarembó, amplificó para la segunda PCR dirigida al gen *gltA* (cebadores CS239/CS1069). Además, ninguna de las siete muestras amplificó para el gen *ompA*. La secuencia consenso obtenida fue de 803 pb, la cual demostró una identidad de entre 99,4 a 100% con varias secuencias para el gen *gltA* de *R. bellii* procedentes de garrapatas de diferentes géneros depositadas en GenBank. Esto coincide con el análisis filogenético, donde la secuencia forma una clado con un soporte de 100% con secuencias de *R. bellii* (Figura 2). Para la PCR dirigida al gen 16S ARNr de rickettsiales de la familia *Anaplasmataceae*, una muestra perteneciente a una hembra de *A. aureolatum* (A68) amplificó con los cebadores EHR16SD/EHR16SR y se obtuvo una secuencia de 309 pb, la cual posee una identidad del 100% con *Ca. Midichloria* sp. determinada en *A. aureolatum* de Buenos Aires, Argentina (GenBank MW599399) y de 99,68% con otras *Ca. Midichloria* sp. provenientes de otras especies de garrapatas (GenBank KY910125, EF687768, AF497583). Esta muestra no amplificó con los cebadores fD1/EHR16SR y EHR16SD/rP2 por lo que no se obtuvo un fragmento de mayor longitud para este gen.

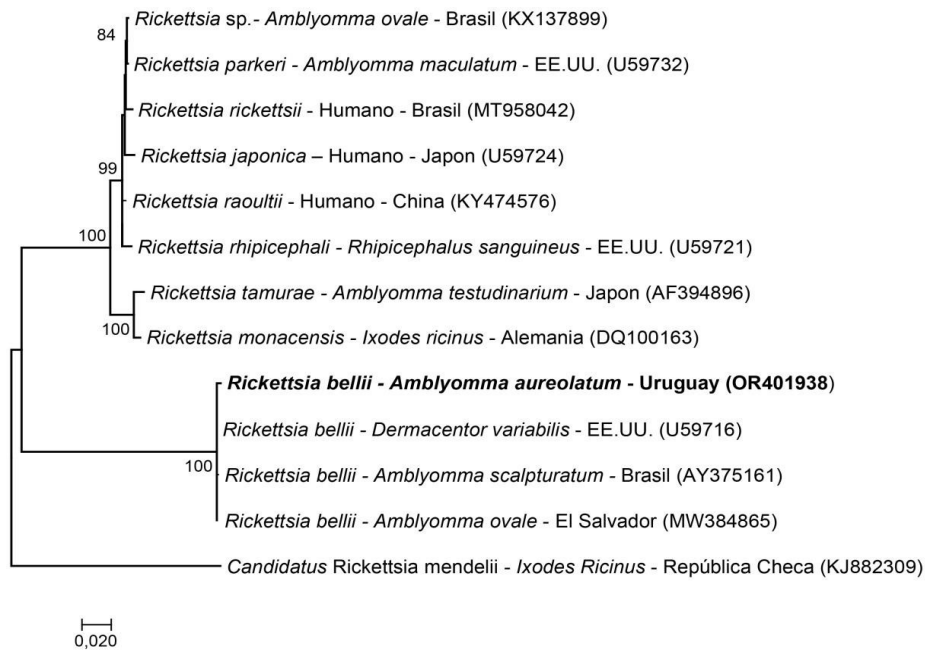


Figura 2. Árbol filogenético construido con secuencias parciales del gen citrato sintasa (*gltA*) mediante el método de máxima verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros. Los números representan el soporte bootstrap generado a partir de 1000 réplicas, se muestran los valores >70. Las secuencias obtenidas están en negrita y los números de acceso a GenBank están entre paréntesis.

Con respecto a la detección de piroplasmas, una muestra, compuesta por tres machos (A41_1) resultó positiva a la PCR dirigida al gen *18S ARNr*, generando una secuencia de 528 pb cuya identidad fue de entre 99,24 a 100% con secuencias de *R. vitalii* obtenidas sobre perros y zorros de Argentina, Brasil y Uruguay. En el análisis filogenético la secuencia obtenida forma una clado con un alto soporte con secuencias de *R. vitalii* de los países anteriormente mencionados (Figura 3).

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso OR401938 para *gltA* de *R. bellii*, OR391750 para *16S ARNr* de *Ca. Midichloria* sp. y OR390073 para *18S ARNr* de *R. vitalii* respectivamente.

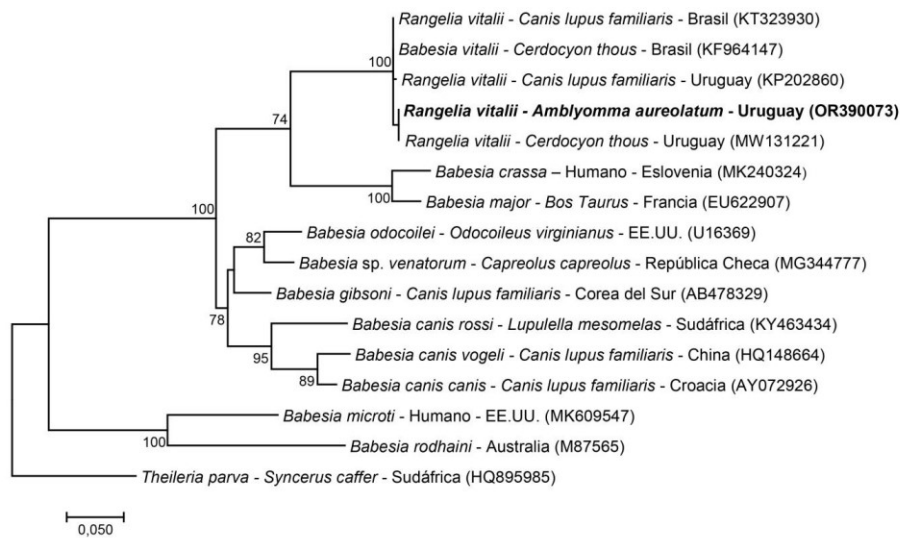


Figura 3: Árbol filogenético construido con secuencias parciales del gen *18S ARNr* mediante el método de máxima verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros. Los números representan el soporte bootstrap generado

a partir de 1000 réplicas, se muestran los valores >70. Las secuencias obtenidas están en negrita y los números de acceso a GenBank están entre paréntesis. *Theileria parva* fue incluido como grupo externo.

Discusión

El hallazgo de *A. aureolatum* parasitando a un humano, además de ser el primero para el país, es un dato relevante debido a la importancia de esta especie como vector de las rickettsiosis causadas por *R. rickettsii* y *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlántica (Pinter y Labruna, 2006; Barbieri et al., 2014). Si bien es una especie que parasita en forma esporádica a humanos, este reporte de una hembra concuerda con Guglielmone y Robbins (2018) y Guglielmone et al. (2021) quienes mencionan que los adultos y en particular las hembras tienen mayor tendencia a parasitar humanos.

En cuanto a los microorganismos determinados, el hallazgo de *R. bellii* corresponde al primero para Uruguay y a la tercera *Rickettsia* en garrapatas, tras *Rickettsia parkeri* en *Amblyomma triste* (Venzal et al., 2004) y *Rickettsia* sp. en *Ixodes fuscipes* (Sebastian et al., 2020). Hasta el momento, los dos reportes de *R. bellii* infectando a *A. aureolatum* corresponden a uno para San Pablo por Brasil (Pinter y Labruna, 2006) y otro para Buenos Aires, Argentina (Cicuttin et al., 2022).

De las 117 garrapatas procesadas, solo un lote compuesto por 10 ninfas de vegetación resultó positivo para esta *Rickettsia*. Esta baja prevalencia de infección coincide con los resultados de Pinter y Labruna. (2006) quienes obtuvieron 10 positivos a *R. bellii* de 669 (1,49%) ejemplares adultos de *A. aureolatum* extraídos de perros en un área endémica de rickettsiosis en San Pablo, Brasil.

Otro organismo rickettsial detectado fue *Ca. Midichloria* sp., un endosimbionte perteneciente a la familia *Midichloriaceae* dentro del orden Rickettsiales, cuya secuencia resultó idéntica a la determinada por Cicuttin et al. (2022) en *A. aureolatum* de Argentina. Siendo este el segundo reporte de un endosimbionte de la familia *Midichloriaceae* en garrapatas en Uruguay tras el de un microorganismo relacionado a *Candidatus* *Midichloria mitochondrii* en *A. triste* (Venzal et al., 2008). Este microorganismo se transmite en forma transovárica y se localiza en el interior de las mitocondrias de los invertebrados y no parece ser patógeno para los humanos (Richard et al., 2009).

Con respecto a los piroplasmas, la determinación de *R. vitalii* es la primera en garrapatas para Uruguay. Si bien *A. aureolatum* es considerado el vector natural de *R. vitalii* (Soares et al., 2018), todos los reportes en nuestro país provenían hasta el momento de perros con rangelirosis clínica, algunos de los cuales estaban parasitados con *A. aureolatum* o de muestras de sangre o tejidos del zorro *C. thous* obtenidas de animales atropellados en rutas (Soares et al., 2015; Rivero et al., 2017; De Lorenzo et al., 2021).

Agradecimientos

Los autores de este trabajo desean expresar su agradecimiento a los productores y encargados de establecimientos por permitirnos acceder a los predios para obtener las muestras. Este trabajo fue parcialmente financiado en el marco del Proyecto I+D CSIC 2014 ID 396: Detección de patógenos rickettsiales transmitidos por garrapatas de interés sanitario para humanos y mascotas en Uruguay.

Referencias bibliográficas

- Barbieri AR, Jonas Filho M, Nieri-Bastos FA, Souza Jr JC, Szabó MP, Labruna MB. 2014. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 848-853. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.010
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Venzal JM, Nava S. 2022. *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* sp. and *Candidatus* *Midichloria* sp. associated to ticks from a protected urban area in Buenos Aires City (Argentina). *Exp. Appl. Acarol.* 86: 271-282. DOI: 10.1007/s10493-022-00684-0
- Copat B, Bastiani PV, Castellarin Jaconi FC, Damarem WW, Streck AF, de Oliveira EC, Sonne, L, França RT. 2019. Presentation of hemolytic and hemorrhagic rangelirosis in *Cerdocyon thous*. *Ticks Tick Borne Dis.* 10: 690-693. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.02.010.
- De Lorenzo C, Boabaid FM, de Oliveira LGS, Bianchi MV, Félix ML, Armúa-Fernández MT, Soares JF, Venzal JM, Sonne L. 2021. *Rangelia vitalii* in free-living crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Uruguay. *Ticks Tick Borne Dis.* 12: 101765. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2021.101765

- Félix ML, Muñoz-Leal S, Carvalho LA, Queirolo D, Remesar Alonso S, Nava S, Armúa-Fernández MT, Venzal JM. 2021. Molecular characterization of novel *Ehrlichia* genotypes in *Ixodes auritulus* from Uruguay. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* 1: 100022. DOI: 10.1016/j.crpvbd.2021.100022
- Fredo G, Bianchi MV, De Andrade CP, De Souza SO, Leite Filho RV, Bandinelli MB, Amorim DB, Driemeier D, Sonne L. 2015. Natural Infection of Wild Canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the Intraendothelial Piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil. *J. Wildl. Dis.* 51: 880-884. DOI: 10.7589/2014-12-283
- Guglielmone AA, Nava S, Robbins RG. 2021. Neotropical Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae). Ed. Springer International Publishing. Berlin/Heidelberg, Germany. 486 pp. DOI: 10.1007/978-3-030-72353-8
- Guglielmone AA, Robbins RG. 2018. Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Parasitizing Humans. Ed. Springer. Cham, Switzerland 230 pp. DOI: 10.1007/978-3-319-95552-0
- Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TT. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007. 102: 793-801. DOI: 10.1590/S0074-02762007000700003
- Inokuma H, Parola P, Raoult D, Brouqui P. 2001. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Vet. Parasitol.* 99: 335-339. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00470-8
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- Labruna M, Whitworth T, Horta M, Bouyer D, McBride JW, Pinter A, 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: 90-98. DOI: 10.1128/JCM.42.1.90-98.2004.
- Labruna MB. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann. New York Acad. Sci.* 1166: 156-166. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x
- Martins TF, Lado P, Labruna MB, Venzal JM. 2014. El género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en Uruguay: especies, distribución, hospedadores, importancia sanitaria y claves para la determinación de adultos y ninfas. *Vet. (Montevideo)* 50: 26-41.
- Nava S, Venzal JM, Acuña DG, Martins TF, Guglielmone AA. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. Academic Press. 372 pp.
- Oteo JA, Nava S, de Souza R, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, Labruna MB, Zavala-Castro J. 2014. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev. Chil. Infectol.* 31: 54-65. DOI: 10.4067/S0716-10182014000100009
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26: 657-702. DOI: 10.1128/cmr.00104-13
- Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. 2000. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94: 707-708. DOI: 10.1016/S0035-9203(00)90243-8
- Pinter A, Labruna MB. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078: 523-529. DOI: 10.1196/annals.1374.103
- Richard S, Seng P, Parola P, Raoul D, Davoust B, Brouqui P. 2009. Detection of a new bacterium related to '*Candidatus* Midichloria mitochondrii' in bed bugs. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 84-85. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02244.x
- Rivero R, Minoli P, Parodi P, Matto C, Armúa-Fernández MT, Giannechini E, Carvalho L, Venzal JM. 2017. Descripción de un foco de rangeliosis canina en el litoral noroeste del Uruguay. *Vet. (Montevideo)* 53: 21-37. DOI: doi.org/10.29155/vet.23.208.1
- Roux V, Fournier P, 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: 2058-2065. DOI: 10.1128/jcm.34.9.2058-2065.1996
- Sarasúa LM, Donati NR. 1976. Constatación de Babesiosis canina en el departamento de Artigas (Uruguay). *Vet. (Montevideo)* 12: 137-139.

- Sebastian P S, Flores FS, Saracho-Bottero MN, Tarragona EL, Venzal JM, Nava S. 2020. Molecular detection of rickettsial bacteria in ticks of the genus *Ixodes* from the Southern Cone of America. *Acta Trop.* 210: 105588. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105588
- Silveira JA, D'Elia ML, de Oliveira Avelar I, de Almeida LR, Dos Santos HA, de Magalhães Soares DF, Ribeiro MF, Dos Santos Lima W, Ecco R. 2016. *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 5: 280-285. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2016.09.003
- Soares HS, Marcili A, Barbieri ARM, Minervino AHH, Moreira TR, Gennari SM, Labruna MB. 2017. Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 26: 115-121. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2017.05.002
- Soares JF, Costa FB, Girotto-Soares A, Da Silva AS, França RT, Taniwaki SA, Labruna, MB. 2018. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelioidosis. *Ticks Tick Borne. Dis.* 9: 1221-1234. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.004
- Soares JF, Carvalho L, Maya L, Dutra F, Venzal JM, Labruna MB. 2015. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Vet. Parasitol.* 210: 98-101. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.03.013
- Soares JF, Dall'Agnol B, Costa FB, Krawczak FS, Comerlato AT, Rossato, BCD, Linck CM, Sigahi EKO, Teixeira RHF, Sonne L, Hagiwara MK, Gregori F, Vieira MIB, Martins JR, Reck JRJ, Labruna MB. 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol.* 202: 156-163. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.02.058.
- Soares JF, Girotto A, Brandão PE, Da Silva A S, França RT, Lopes ST, Labruna, MB. 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180: 203-208. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.03.024
- Soares JF. 2014. História natural da rangelioidose. Tesis Doctoral. Faculdade de Medicina Veterinárias y Zootecnia. Universidade de São Paulo, Brasil. 121 pp. DOI: 10.11606/T.10.2014.tde-19092014-092438
- Souza VKS, Dall'Agnol B, Souza UA, Webster A, Peters FB, Favari MR, Mazim, FD, Rocha FL, Tirelli FP, Soares JF, Jardim MMA, Trigo TC, Reck J. 2019. Detection of *Rangelia vitalii* (Piroplasmida: Babesiidae) in asymptomatic free-ranging wild canids from the Pampa biome. Brazil. *Parasitol. Res.* 118: 1337-1342. DOI: 10.1007/s00436-019-06245-6.
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752
- Venzal JM, Estrada-Peña A, Portillo A, Mangold AJ, Castro O, de Souza C G. Oteo JA. 2008. Detection of alpha and gamma-proteobacteria in *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) from Uruguay. *Exp. Appl. Acarol.* 44: 49-56. DOI: 10.1007/s10493-007-9126-6
- Venzal JM, Portillo A, Estrada-Peña A, Castro O, Cabrera PA, Oteo JA. 2004. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerging Infect. Dis.* 10:1493. DOI: doi.org/10.3201%2F1008.030999
- Weisburg WG, Bams SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 679-703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991

Tabla 1: Datos de las muestras de *Amblyomma aureolatum* utilizadas en el estudio.

Código muestra	Fecha	Localidad (Coordenadas)	Obtenido de:	Nº, estadio y procesamiento para PCR (lotes)
Am32z	13/06/2016	Ruta 3 y rotonda Salto Grande, Salto (31°20'56"S, 57°51'45"O)	<i>Cerdocyon thous</i>	1 H* (1 lote)
A61	14/10/2016	Cuevas de San Antonio, Salto (31°20'34"S, 57°58'53"O)	Perro	1 H, 1 M** (2 lotes)
A65	29/10/2016	Cuevas de San Antonio, Salto (31°20'34"S, 57°58'53"O)	Perro	1 H (1 lote)
A63	20/10/2016	Cuevas de San Antonio, Salto (31°20'34"S, 57°58'53"O)	Perro	1 H (1 lote)
A67	25/10/2016	Ruta 5, Km 465, Rivera (31°11'22"S, 55°39'09"O)	<i>Cerdocyon thous</i>	1 M (1 lote)
A68	26/10/2016	Proximidades Cortumes, Rivera (31°43'52"S, 55°11'02"O)	Perro	1 H (1 lote)
A69	26/10/2016	Estancia Casalás, Rivera (31°39'49"S, 55°03'02"O)	Perro	1 H (1 lote)
A71-1	26/10/2016	Estancia Casalás, Rivera (31°39'49"S, 55°03'02"O)	Vegetación	7 N*** (1 lote)
A71-2	26/10/2016	Estancia Casalás, Rivera (31°39'49"S, 55°03'02"O)	Vegetación	7 N (1 lote)
A72-1	27/10/2016	A° Rubio Chico, Valle del Lunarejo, Rivera (31°08'29"S, 55°54'01"O)	Vegetación	9 N (1 lote)
A72-2	27/10/2016	A° Rubio Chico, Valle del Lunarejo, Rivera (31°08'29"S, 55°54'01"O)	Vegetación	9 N (1 lote)
A73-1	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	10 N (1 lote)
A73-2	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	10 N (1 lote)
A73-3	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	10 N (1 lote)
A73-4	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	9 N (1 lote)
A74-1	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	3 H (1 lote)
A74-2	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	4 H (1 lote)
A74-3	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	3 M (1 lote)
A74-4	28/10/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	4 M (1 lote)
Am41-1	13/8/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	3 M (1 lote)
Am41-2	13/8/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	3 M (1 lote)
Am42-1	13/8/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	6 N (1 lote)
Am42-2	13/8/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	6 N (1 lote)
Am42-3	13/8/2016	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Vegetación	6 N (1 lote)
A121	15/9/2017	Gruta de los Cuervos, Tacuarembó (31°37'08"S, 56°02'47"O)	Humano	1H (sin PCR)

H*: hembra, M*: macho, N***: ninfa