

Universidad Autónoma de Baja California
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**“SEROPREVALENCIA DE RIQUETSIOSIS EN HUMANOS Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *RICKETTSIA RICKETTSII* EN
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO”**

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

**PRESENTA:
M.V.Z ANGÉLICA MARÍA ESCÁRCEGA ÁVILA**

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

**ASESORES:
DR. ALBERTO BARRERAS SERRANO
DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

Agosto del 2011

Seroprevalencia de rickettsiosis en humanos y caracterización molecular de *Rickettsia rickettsii* en Ensenada, Baja California, México. Tesis presentada por MVZ. Angélica María Escárcega Ávila como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias que ha sido aprobada por el comité particular indicado.

Director/

Dr. Luis Tinoco Gracia

Asesor/

Dr. Alberto Barreras Serrano

Asesor/

Dr. Gilberto López Valencia

Mexicali Baja California,

Agosto del 2011

Seroprevalencia de rickettsiosis en humanos y caracterización molecular de *Rickettsia rickettsii* en Ensenada, Baja California, México.

Resumen:

La rickettsiosis causada por *Rickettsia rickettsii* es capaz de infectar a vertebrados, incluyendo a humanos. Los síntomas son; fiebre alta, cefalea, mialgia, náusea, vómito, dolor abdominal y tos. El presente estudio observacional, descriptivo seccional cruzado, se llevo a cabo en la Cd. de Ensenada, Baja California, e incluyó 384 muestras de sangre de humanos. Los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit *R. rickettsii* ELISA[®] Helica Biosystems, Inc., de uso en perros adaptado para humanos utilizando un conjugado anti-IgG humana. Para determinar la sensibilidad y la especificidad en humanos se sometieron 32 muestras a IFA. Para el diagnóstico e identificación molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas se utilizaron iniciadores específicos. La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis en humanos fue 3.9% (95% IC 0.8-5.3), la seropositividad no mostró asociación con el sexo, edad, ocupación, perros en hogar, programa de desparasitación de mascotas contra garrapatas, tipo de patio y movilidad de perros entre el hogar y la calle. El nivel de concordancia entre ELISA e IFA, según la prueba kappa fue de sustancial acuerdo. La seroprevalencia en perros fue del 63% y considerando que los perros son importantes centinelas de la enfermedad y acarreadores de garrapatas infectadas, para disminuir el riesgo en humanos se recomienda llevar a cabo un programa preventivo. Se identifico molecularmente la bacteria en perros y garrapatas, teniendo una homología con *R. rickettsii* del 100% y 99% respectivamente.

Seroprevalence rickettsiosis in humans and molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* in Ensenada, Baja California, Mexico.

Abstract:

Rickettsiosis caused by *Rickettsia rickettsii* it is capable of infecting vertebrates, including humans. The symptoms are high fever, headache, myalgia, nausea, vomiting, abdominal pain and cough. Mortality can be up to 30% in untreated patients. This observational cross-sectional descriptive study included 384 samples of humans in Ensenada, Baja California. Antibodies against *R. rickettsii* were measured with the kit *R. rickettsii* ELISA ® Helica Biosystems, Inc., adapted for use in humans using a human anti-human IgG conjugate. To determine the sensitivity and specificity in 32 human samples were submitted to IFA. For the molecular diagnosis of *R. rickettsii* in dogs and ticks specific primers were used. The seroprevalence adjusted rickettsiosis in humans was 3.9% (95% IC, 0.8-5.3), seropositivity was not associated with sex, age, occupation, household dogs, pet deworming program against ticks, the type of ground floor, and mobility of dog between home and the street. Resulting in substantial agreement of kappa between ELISA and IFA, it follows that the results of seroprevalence of this work are reliable. Seroprevalence values obtained in dogs were high (63%) and considering that dogs are important sentinels of the disease and carriers of infected ticks, to reduce the human risk is recommended to carry out a preventive program. The bacterium was identified molecularly in dogs and ticks, having a homology with *R. rickettsii* of 100% and 99% respectively.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Definición de rickettsiosis	3
<i>Epidemiología de rickettsiosis en humanos y perros</i>	3
<i>Factores de riesgo asociados a rickettsiosis</i>	5
<i>Rickettsiosis en México</i>	9
Métodos de diagnóstico	12
<i>Cultivo</i>	12
<i>PCR</i>	14
<i>Identificación y caracterización molecular en perros y garrapatas</i>	15
<i>IFA</i>	15
<i>ELISA</i>	17
<i>Western blot</i>	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Estudio en humanos	19
<i>Marco muestral del área de estudio</i>	19
<i>Consideraciones éticas y criterios de inclusión</i>	19
<i>Cálculo del tamaño de muestra</i>	19
<i>Toma de muestras</i>	20
<i>Análisis serológicos</i>	20
<i>Factores de riesgo y manifestaciones clínicas</i>	22
<i>Análisis estadístico</i>	22
Estudio piloto en perros y garrapatas	24
<i>Marco muestral</i>	24
<i>Toma de muestras</i>	24
<i>Análisis serológico</i>	25

<i>Caracterización molecular de Rickettsia rickettsii en perros y garrapatas</i>	25
RESULTADOS	27
1. Estudio en humanos	27
<i>El valor generado de seroprevalencia en este estudio fue mayor que cero ($P < 0.05$)</i>	27
<i>El valor generado de seroprevalencia en hombres y mujeres no fue diferente ($P > 0.05$), así como también entre grupos de edad y ocupación.</i>	27
<i>No se observo asociación ($P > 0.05$) entre los factores de riesgo a evaluar con los resultados seropositivos a riquetsiosis</i>	27
<i>Evaluación de la asociación de signos clínicos con la seropositividad a riquetsiosis</i>	27
<i>Prueba de concordancia entre los resultados de ELISA (modificado para su uso en humanos) con los resultados de IFA</i>	28
2. Estudio piloto en perros y garrapatas	29
<i>Análisis serológico en perros</i>	29
<i>Caracterización molecular de R. rickettsii en perros y garrapatas</i>	30
DISCUSIONES	33
CONCLUSIONES	40
LITERATURA CITADA	41
ANEXO 1.....	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Manifestaciones clínicas asociadas a la seropositividad de rickettsiosis	28
2. Perros positivos a rickettsiosis por ELISA de la ciudad Ensenada	29

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Casos sospechosos por grupo de edad en Baja California 2009. Encuesta de rickettsiosis 2009/Dpto. Epidemiología/Servicios de Salud Pública de Baja California .	11
2. Métodos de diagnóstico de rickettsiosis de acuerdo a la fase de la enfermedad	18
3. Resultado positivo a rickettsiosis, de la aplicación de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta	29
4. Análisis de la electroforesis en gel de productos de PCR para <i>R. rickettsii</i> de muestra de sangre de perro y de garrapata.....	30
5. Cromatograma de la secuenciación de un segmento de 401 pb de <i>gltA</i> de <i>R. rickettsii</i> del producto del PCR de un perro en Ensenada B.C., México, mostrando una homología del 100% con <i>R. rickettsii</i> (número de acceso del Genbank CP000766.2)	31
6. Cartograma de la secuenciación de un segmento de 401 pb de <i>gltA</i> de <i>R. rickettsii</i> del producto del PCR de una garrapata identificada morfológicamente como <i>R. sanguineus</i> de Ensenada B.C., México, mostrando una homología del 99% con <i>R. rickettsii</i> (número de acceso del Genbank CP000766.2)	32

INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis, causadas por bacterias del género *Rickettsia*, constituyen un problema grave de salud pública a nivel mundial, por la dificultad en el diagnóstico y los desenlaces fatales cuando no existe una intervención temprana en el tratamiento. La mayoría de estas bacterias se asocian con garrapatas, las cuales son sus vectores y reservorios, sin embargo algunas son transmitidas por piojos, pulgas o ácaros. Las enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas, han ido en aumento en los últimos años gracias al incremento de las temperaturas. La fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR) es causada por *Rickettsia rickettsii*, bacteria intracelular obligada que causa más muertes al año en E.U. (Raoult y Parola, 2007). Los síntomas primarios de FMMR son muy inespecíficos; incluyen fiebre alta, dolor de cabeza severo y dolor muscular; pueden a menudo ser acompañados por náusea, vómito, dolor abdominal y tos. Aunque los síntomas son inespecífico es importante evaluar cuales pudieran presentar asociación con la seropositividad a rickettsiosis (Eremeeva et al., 2001). La mortalidad por esta enfermedad puede ser hasta el 30% en pacientes no tratados a tiempo con antibióticos (Walker, 1995). Varios factores de riesgo han sido asociados a rickettsiosis, incluyendo la edad, el género masculino, la convivencia con perros infestados con el vector (Parola 2005; Raoult y Parola, 2007). Los métodos de diagnóstico eficaces para esta enfermedad son: Cultivo, PCR, Western blot, ELISA e IFA (Tzianabos et al.,

1989; Roux et al., 1996; Kováčová et al., 2000; Labruna et al., 2004; Anaya et al., 2007).

En base a lo anterior se planteó el siguiente objetivo: estimar la seroprevalencia para rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos y medir su asociación a factores de riesgo y manifestaciones clínicas, además caracterizar molecularmente esta bacteria en perros y garrapatas de Ensenada, B.C.

REVISIÓN DE LITERATURA

Definición de riquetsiosis

La fiebre manchada de las montañas rocosas (FMRR) es una enfermedad causada por *Rickettsia rickettsii*, bacteria gram negativa intracelular obligada con un diámetro aproximado de 0.8-2.0 μm de longitud y 0.3-0.5 μm de diámetro. Estas especies se relacionan a artrópodos, asociados a bacterias y son capaces de infectar a vertebrados, incluyendo los humanos, generalmente como huéspedes accidentales (La Scola y Raoult, 1997).

Epidemiología de riquetsiosis en humanos y perros. Esta enfermedad afecta a humanos de todo el mundo (Labruna et al., 2004), en Estados Unidos de Norte América se reportan 1,200 casos por año, estas enfermedades se distribuyen geográficamente de acuerdo al vector que las trasmite. En norte América los principales vectores de esta enfermedad son *Dermacentor andersoni* en las Montañas Rocosas, *Dermacentor variabilis*, en el este, en la costa Atlántica y en la costa oeste. En México, los principales vectores son *R. sanguineus* y *Amblyomma americanum*, así como en Centro y Sudamérica (La Scola y Raoult, 1997). La garrapata *R. sanguineus* también conocida como la garrapata café del perro, es la garrapata mayormente distribuida en el mundo, parasita algunos mamíferos incluyendo humanos accidentalmente y puede transmitir algunas enfermedades como *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Coxiella*, (Dantas Torres., 2008), este vector se encuentra ampliamente distribuido en el territorio mexicano así como en Centro y Sudamérica. En un estudio en la Cd. de Mexicali Baja

California, se encontró que el 59.6% del estudio estaban parasitados por garrapatas, de las cuales el 100% fueron identificadas de acuerdo a su morfología como *R. sanguineus* (Tinoco-Gracia et al., 2009).

La FMMR sigue siendo la enfermedad más letal transmitida por artrópodos en Norteamérica (Dirk y Elson, 2005), es una enfermedad aguda con un periodo de incubación de 3-10 días, que inicia cuando la bacteria *R. rickettsii* presente en las glándulas salivares de una garrapata vector es inoculada dentro de la dermis de donde se distribuye y coloniza el citoplasma de las células endoteliales de los vasos generando vasculitis, hipoperfusión y daño orgánico (Dumler y Walker 2005; Estripea et al., 2007,). Posterior a esto se genera, permeabilidad vascular que es muy peligrosa cuando afecta órganos como los pulmones y el cerebro (Dumler y Walker 2005). Los síntomas primarios de FMMR en humanos son muy inespecíficos; incluyen fiebre alta, dolor de cabeza severo y dolor muscular; pueden a menudo ser acompañados por náusea, vómito, exantema, dolor abdominal, desórdenes respiratorios y coagulopatías (Eremeeva et al., 2001). Sin embargo estos hallazgos son difíciles de diferenciar de algunos que se presentan en las infecciones virales (Dirk y Elson, 2005). La mayoría de los pacientes no presenta la clásica triada que corresponde a fiebre, exantema e historia de mordedura de garrapata al inicio. Frecuentemente el exantema aparece días después del inicio de la fiebre y puede volverse petequial (CDC., 2003). El exantema característico que aparece al cuarto día, se inicia en muñecas y tobillo, se extiende a todo el cuerpo y tiende a desaparecer a medida que baja la fiebre, pero que puede

dejar manchas pigmentadas durante semanas, al principio de máculas rosas, que palidecen por presión y que en dos o tres días se tornan rojo oscuro o violáceas, estas lesiones máculo-papulares posteriormente se convierten en lesiones petequiales. En cuadros más avanzados suele presentarse pulso débil, hipotensión y obnubilación. También hepatomegalia y sordera transitoria. Uno de los hallazgos característicos en el hemograma es plaquetas bajas. Y tiene un periodo de convalecencia prolongada (Dumler y Walker 2005). La falla renal aguda es un factor de riesgo para desenlaces fatales (Dirk y Elson, 2005). La mortalidad por esta enfermedad puede ser hasta del 30% en pacientes no tratados a tiempo con antibióticos (Walker, 1995). La FMMR puede causar una severidad similar o enfermedad fatal en perros, comúnmente presentan poliartritis cuyo mecanismo en las enfermedades transmitidas por garrapatas corresponde a la deposición de inmunocomplejos y que en algunos casos como en borreliosis está asociada con sinovitis como infección primaria (Demma et al., 2006; Foley et al., 2007).

Factores de riesgo asociados a riquetsiosis. Varios factores de riesgo han sido asociados a riquetsiosis como la edad, afectando más a personas en edad productiva (18 a 40 años), al género masculino, al contacto con perros infestados con *R. sanguineus* (Demma et al., 2005) y a temperaturas altas de verano; el único factor de riesgo genético asociado a la enfermedad que se ha determinado claramente es la deficiencia de la deshidrogenasa glucosa-6-fosfato que ocurre en aproximadamente el 12% de la población de la raza afroamericana (Parola et al., 2005; Raoult y Parola, 2007).

Existen publicaciones científicas de estudios realizados en diferentes partes del mundo con diferentes escenarios de la enfermedad de esto depende en gran parte los valores de seroprevalencias reportados, por ejemplo existen estudios donde las muestras se toman de pacientes sin tomar en cuenta si presentaban signos clínicos de la enfermedad y otros donde sí se consideraron, en los cuales reportaron seroprevalencias más altas (Hidalgo et al., 2007, Satoh et al., 2001).

En Brasil un estudio realizado con muestras de sangre de niños sanos, sin signos clínicos de la enfermedad arrojó una seroprevalencia del 10.6% (35/331) en una región donde la enfermedad es endémica, el diagnóstico se realizó con la prueba serológica IFA (Galvão et al., 2002). En un estudio realizado en el 2003, fueron incluidas muestras de sangre de niños de 1 a 17 años de edad, de diferentes ciudades del sur de E.U.A., reportan una seroprevalencia del 16% (321/1999), encontrando asociación entre la seropositividad y la edad los niños, siendo más susceptibles los niños de 13-17 años, cabe mencionar que las muestras recolectadas fueron de niños que acudieron por cualquier motivo a alguno de los laboratorios que participaron en el estudio (Marshall et al., 2003). El países de América Latina que ha reportado la seroprevalencia más alta para esta enfermedad en humanos es Colombia en un estudio que se llevó a cabo en el año 2007 en una zona rural de este país, reportando una seroprevalencia en humanos del 40.3%(370/149), el diagnóstico se realizó por medio de IFA, en cuanto a los factores de riesgo asociados sólo se encontró asociación de la seropositividad con la región,

también se observó que del total de los positivos el 57.7% eran mujeres, el 70.94% de los positivos estuvieron expuestos a mordedura de garrapatas, el 88.4 % de las garrapatas estaban en la fase adulta. No se encontró asociación en cuanto a ocupación, grado de escolaridad, la presencia de animales domésticos en el hogar, desplazamiento de los perros dentro y fuera de la casa (Hidalgo et al., 2007).

En cuanto a prevalencias en perros se refiere, se han reportado en algunos lugares del mundo por ejemplo Rodgers y colaboradores en (1989) reportan una seroprevalencia del 33% (IFA) en Oklahoma E.U.A., en Brasil (2004) Horta y colaboradores publican una seroprevalencia del 31% (IFA). Existen estudios donde se realizaron diagnósticos de la enfermedad en humanos y perros, la mayoría concluye en que los perros son centinelas importantes para la rickettsiosis. Un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil en el que se procesaron muestras de 25 perros y 35 humanos procedentes de un área endémica de la Fiebre Manchada Brasileña, donde se encuentra presente el vector *Amblyomma aureolatum*. Se utilizó la prueba de IFA para el diagnóstico obteniendo los siguientes resultados 7 (28%) de los 25 perros resultaron positivos a *R. rickettsii* y sólo un humano resultó positivo de los 35 analizados (2.8%). También concluyen que los perros son importantes centinelas de la presencia de *R. rickettsii* en áreas donde la *A. aureolatum* es el vector más importante de FMMR (Pinter et al., 2008).

Otro estudio similar en Sao Paulo Brasil, en el cual los investigadores obtuvieron sueros sanguíneos de humanos, caballos, perros y burros todos sin

signos clínicos de la enfermedad procedentes de 3 granjas del municipio de Pedreria, un área endémica de la fiebre manchada brasileña, se detectaron anticuerpos contra *R. rickettsii* mediante IFA en el 77.3% (17) de los caballos, 31.3% (5) de los perros, los burros y los humanos resultaron negativos a la prueba (Horta y Labruna., 2004).

Satoh y colaboradores evaluaron la presencia de anticuerpos contra *R. japonica* en 517 perros (430 perros callejeros y 87 perros caseros) y sueros de 164 humanos en Okinawa, mediante la prueba de IFA. Los rangos de seropositividad entre los perros de la calle y los que eran mascotas fue significativa 30.7 contra 4.06% respectivamente. En humanos los sueros se obtuvieron de dos ciudades japonesas de Okinawa y Sapporo donde también se observó una marcada diferencia 45.1 y 12.0% respectivamente (Satoh et al., 2001).

En otro estudio se examinó un perro que presentaba petequias, inhabilidad para incorporarse, mucosas pálidas y trombocitopenia. El perro murió, y ocho días después un segundo perro del mismo dueño murió con signos clínicos característicos de FMRR. Después de dos semanas el dueño de los perros muestra los siguientes signos clínicos: mialgia, fiebre, náuseas, vómito, disminución del apetito, letargia y erupción cutánea en cara y cuerpo. Fallece a los ocho días de haber presentado los signos clínicos característicos de la enfermedad, siendo seronegativo a la prueba de IFA. En la necropsia se obtuvieron muestras de riñón, hígado y vejiga resultado positivo a PCR de *Rickettsia* spp. Los autores de este trabajo también afirman que el perro sirve

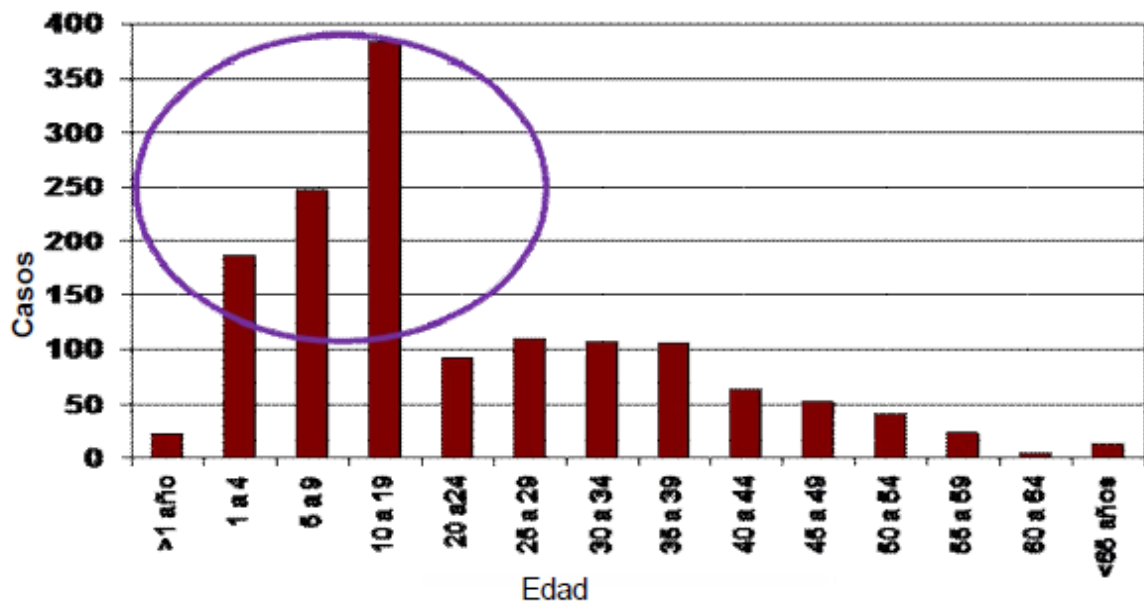
de centinela para la enfermedad en cuestión, además sugieren la necesidad de comunicación entre médicos veterinarios y médicos cirujanos cuando este tipo de casos se presentan (Elchos y Goddard., 2003).

Riquetsiosis en México. En México a pesar de la existencia de áreas que reúnen condiciones geográficas, epidemiológicas, demográficas y socioeconómicas, que favorecen la presencia del vector *R. sanguineus* transmisor de riquetsias, existen pocas investigaciones científicas de este tema (Bustamante y Pon 2011). La FMMR recibió sustancial énfasis a principios de los 1930's hasta los 1950's en varios estados del país Sinaloa, Sonora, Coahuila y Durango (Bustamante y Varela 1947). En 1993 se reportó una seroprevalencia del 40% (20/50) en pacientes procedentes de los estados de Yucatán y Jalisco (Zavala et al., 1996), después en 1998 investigadores del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California (IICV-UABC) realizaron el primer trabajo de seroprevalencias de rickettsiosis en perros en México arrojando una seroprevalencia del 16.6% (5/30) y aunque éste fue un estudio piloto, fue de gran ayuda para alertar a la población de Mexicali, Baja California de la existencia de la enfermedad (Romano et al., 1998). Al siguiente año publicaron un artículo donde declaran una seroprevalencia de 5.6% (22/390) para *Rickettsia akari* y un 0.5% (2/390) para *R. rickettsii* en humanos del estado de Yucatán (Zavala et al., 1999). En la comarca Lagunera se reportan casos de riquetsiosis desde 1946 y es hasta el 2008 que se publica otro trabajo donde se dan a conocer los casos de riquetsiosis detectados en pediatría en los años de

1975-2007 dando un total de 115 casos confirmados en este lapso de tiempo, con un promedio de 17 casos por año (De Lara Huerta y Cárdenas Barragán 2008). Existe otro reporte del estado de Yucatán en el que describen 7 casos confirmados en niños menores de 12 años de los cuales fallecen 3 a causa de *Rickettsia rickettsii* (Zavala et al., 2008). En el 2009 Investigadores del IICV-UABC realizaron un trabajo de investigación en base a los resultados obtenidos en el estudio piloto llevado a cabo en 1998 y a un brote de rickettsiosis suscitado en la ciudad de Mexicali, B.C. El estudio constó en dos fases en: la primera consistió en medir la seroprevalencia de rickettsiosis en perros capturados por el centro de control animal y atendidos en clínicas veterinarias de la ciudad en el año 2005 arrojando los siguientes datos una seroprevalencia general del 77%, una seroprevalencia del 77.4% para los perros muestreados en clínicas veterinarias de la ciudad y una seroprevalencia del 84% en perros capturados por el centro de control animal. La segunda etapa se llevó a cabo en el 2009 la cual consistió en medir la seroprevalencia y los factores de riesgo asociados a la enfermedad en perros de la zona urbana y rural de la ciudad, el estudio arrojó los siguientes datos una seroprevalencia general de esta etapa del 66.6%, una seroprevalencia del 59.4% para la zona urbana de la ciudad y una seroprevalencia del 73.9% para la zona rural (Romano et al., 2011). En el estado de Baja California la Secretaría de salud a través del sistema nacional de vigilancia epidemiológica lanzaron un comunicado informativo después del brote de rickettsiosis ocurrido en la ciudad de Mexicali en el cual se muestra el panorama epidemiológico en el Estado de Baja California hasta el año 2009

(figura 1), respecto a esta situación se observó que se estudiaron 1,453 casos sospechosos (se consideran casos sospechosos a pacientes con fiebre de 38 °C. o más, cefalea, mal estado general), 734 probables (se consideran probables a los pacientes con exantema, alteraciones en los resultados de bioquímica hemática, mialgias, dolor abdominal, náuseas o vómito, signos neurológicos, epistaxis, antecedente de mordedura de garrapata, piojo o pulga) y 278 confirmados (Cualquier caso probable confirmado con alguna prueba de laboratorio como ELISA, PCR, aislamiento por cultivo) 275 casos de *R. rickettsii* y 3 de *R. prowazekii*.

Figura 1. Casos sospechosos por grupo de edad en Baja California 2009. Encuesta de rickettsiosis 2009/Dpto. Epidemiología/Servicios de Salud Pública de Baja California.



El grupo escolar fue el que presentó el 56% de los casos estudiados, por el sexo la distribución fue del 58% mujeres y 42% en hombres. En cuanto a la edad el grupo más afectado fue de niños de 10-19 años de edad (figura 2), la

época estacional con mayor incidencia de la enfermedad fue de los meses de marzo a septiembre siendo el grupo escolar el más afectado. La positividad fue del 19% (1 de cada 4 casos detectados como sospechosos fue confirmado), con una letalidad de 2.5%, 13 defunciones sospechosas de las cuales sólo 8 fueron confirmadas (Bustamante y Pon 2011).

Métodos de diagnóstico.

El diagnóstico de esta enfermedad es difícil de realizar en etapas tempranas. Actualmente se conocen métodos moleculares siendo estos los más confiables que usualmente se utilizan como pruebas confirmatorias. También existen las pruebas serológicas que son las más comúnmente utilizadas para estudios epidemiológicos de enfermedades rickettsiales dentro de estas se destacan las siguientes: Fijación de complemento, hemoaglutinación indirecta, aglutinación latex, ELISA, inmunoperoxidasa, ensayo de inmunoblot e inmunofluorescencia. El cultivo celular fue uno de los primeros métodos de diagnóstico, en la actualidad se realiza para otros fines de investigación (Parola y Raoult., 2001). El método de diagnóstico de elección dependerá del objetivo del mismo (figura 3).

Cultivo. Este procedimiento se ha utilizado como método de diagnóstico desde hace muchos años, sin embargo en la actualidad existen otro tipo de pruebas más sencillas, rápidas y eficaces para el diagnóstico de la enfermedad, ya que el cultivo celular cuenta con algunas desventajas dentro de las principales el tiempo que se requiere para obtener los resultados y el difícil acceso a esta técnica ya que sólo laboratorios con un nivel 3 de bioseguridad y

con personal altamente capacitado y con experiencia en el cultivo de bacterias del género *Rickettsia* son capaces de aislar la bacteria de especímenes clínicos y realizar los cultivos en células vivas. En años recientes, el desarrollo del sistema de cultivo celular por aislamiento viral ha aumentado el número de laboratorios equipados para el aislamiento y cultivo de esta bacteria. El aislamiento de las rickettsias hoy en día puede realizarse de muchas muestras por ejemplo: plasma, tejido proveniente de necropsias, biopsia de piel, artrópodos, sangre y coágulo de sangre. También se han utilizado el embrión de pollo y animales de laboratorio para el aislamiento de la bacteria estos últimos se usan frecuentemente para aislar la bacteria de tejidos provenientes de necropsias usualmente contaminados con otras bacterias. El cultivo celular se practica desde hace más de 60 años, este es el método más utilizado para el aislamiento de rickettsias de muestras clínicas. (La Scola et al., 2004). En los últimos años se han desarrollado sistemas de cultivos celulares para el aislamiento e identificación de las diferentes rickettsias. Las células Vero y las L929 de ratón son las más sensibles y utilizadas para el aislar rickettsias. Se deben realizar una extracción de bacterias infectadas del medio de cultivo para después realizar la tinción de Giménez con el fin de determinar el crecimiento de las bacterias y, generalmente, a los 8-10 días se tiene un crecimiento confluyente. Las células HEL (diploides humanas de pulmón embrionario) se usan para la técnica de Shell vial, lo que permite un diagnóstico más rápido de la infección, en alrededor de 24-48 horas (Vestris et al., 2003). La detección de rickettsias dentro de las células se puede realizar mediante la tinción de

Giménez en un microscopio, por inmunodetección o por PCR, si después de los 20 días es negativo a estos métodos el cultivo se considera negativo. La gran ventaja de esta técnica es que una especificidad del 100% (P. Brouqui et al., 2004).

PCR Reacción en cadena de la polimerasa. Este método es considerado una herramienta con muchas ventajas ya que es rápida y eficaz para el diagnóstico y la identificación de las rickettsias en sangre, tejidos, biopsias de piel y hasta en garrapatas. (P. Brouqui et al., 2004) Regnery propuso en 1991 la amplificación del gene que codifica para *OmpA*, lo que permite la diferenciación entre 9 rickettsias del grupo de las fiebres manchadas. En 1994 Ermeeva utiliza una combinación de secuencias de *OmpA* y *OmpB* y, posteriormente, Labruna en el 2004 introduce el gen para la citrato sintetasa *gltA*, con esta metodología se hace un diagnóstico específico de *R. rickettsii* y además permite caracterizar e identificar molecularmente las cepas por secuenciación. Sin embargo este método de diagnóstico tiene algunas desventajas, la sensibilidad del PCR que es del 79% en sangre cuando se utilizan los iniciadores para el fragmento del gen *gltA*, puede ser reducida por varios factores como lo son: la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa, degradación del ADN durante el transporte de la muestra y la terapia con antibióticos antes de tomar la muestra. Además del elevado riesgo de contaminación por la amplificación de productos de PCR anteriores que utilizaron el mismo iniciador (Pierre E. y Raoutl D., 2004).

Identificación y caracterización molecular en perros y garrapatas. La identificación de la bacteria en sangre de humanos es complicada por su limitado periodo de existencia, sin embargo en perros que están en contacto constante con los vectores es probable lograr la identificación debido a reinfecciones (Hidalgo et al., 2009). Las garrapatas pueden ser utilizadas como herramientas epidemiológicas para la detección de la presencia de un patógeno en un área específica, mediante la identificación molecular de la bacteria por PCR, una vez obtenido el producto de PCR se realiza la secuenciación de un fragmento amplificado, el cual se compara con los ya existentes en los bancos de genes, si la similitud es del 100% entre la secuencia obtenida y la secuencia de una bacteria ya conocida la identificación es exitosa, si la secuencia obtenida es diferente a las secuencias disponibles en la base de datos, la bacteria probablemente corresponda a un nuevo género, por lo tanto debe ser aislada. Este método también se puede realizar en sangre y tejidos con el mismo fin (Parola y Raoult 2001). En ninguno de los estudios realizados hasta la fecha se ha podido determinar diferencias significativas en las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *R. rickettsii* aisladas en diferentes regiones del mundo de humanos, perros y garrapatas (Karpathy et al., 2007).

IFA Inmunofluorescencia indirecta. Es la prueba “estándar de oro” de las pruebas serológicas, la más utilizada para el diagnóstico en humanos y animales desde los años 70 permite detectar anticuerpos IgG, IgM o ambas (Newhouse et al., 1978). Los Anticuerpos de clase IgM pueden ser detectados

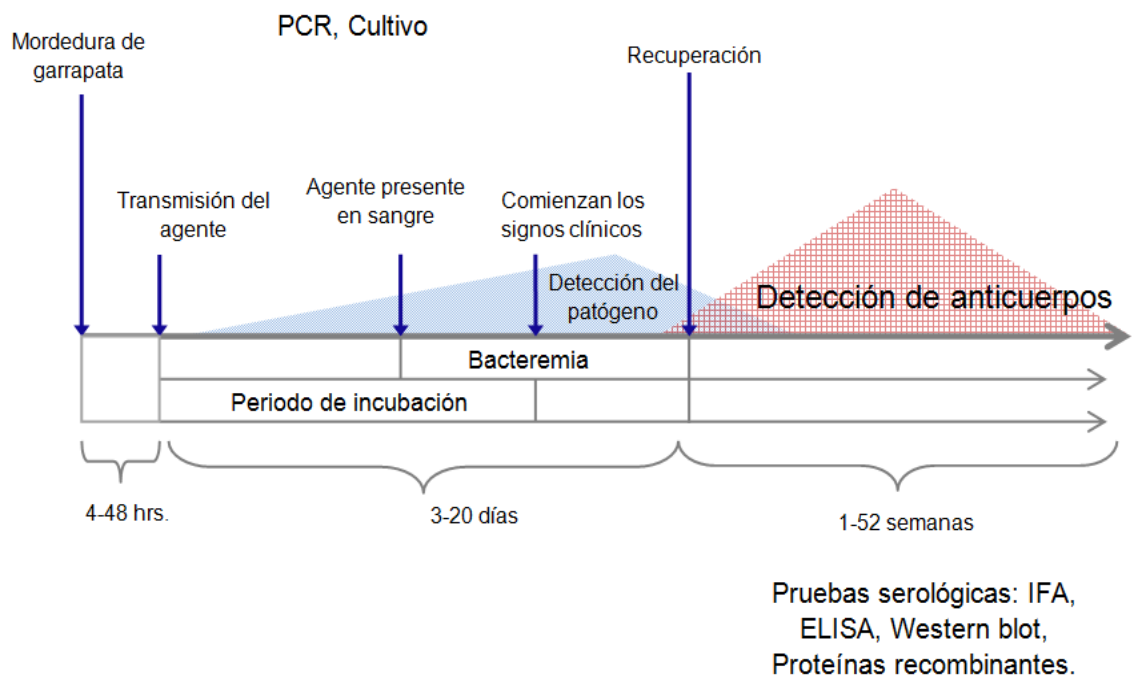
a partir de la primera semana de fase aguda de la enfermedad, a la tercera semana se observa el pico más alto de anticuerpos, estos disminuyen a la semana 16 y son detectables hasta la semana 33, los anticuerpos IgG son detectables a la primera semana pero con menor intensidad que los anticuerpos IgM, el pico más alto de anticuerpos IgG se observa a la semana 7 post infección y son detectables hasta la semana 33, en cambio ambos anticuerpos IgG e IgM juntos son detectables a la primera semana post-infección, el pico de anticuerpos se observa a las 24 semanas y son detectables hasta la semana 66, (Clements et al., 1983). Varios investigadores han reportado diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad de la prueba esto se debe al antígeno utilizado para la fabricación de la prueba, por ejemplo Anaya y colaboradores en el 2008, evaluaron la sensibilidad y especificidad de la prueba IFA IgM reportando 82.0% y 91,7% respectivamente. Jones en 1993 utilizó un antígeno muy específicos como los lipopolisacáridos de membrana para la detección de anticuerpos contra *R. rickettsii* pero de costo elevado, la prueba demostró tener una especificidad del 100% y una sensibilidad del 84.6%. La única desventaja de esta prueba son las reacciones cruzadas que pueden ocurrir entre especies, aunque existe un tipo de ensayo llamado microimmunofluorescencia indirecta que ha resultado ser el más sensible y específica y disminuye la posibilidad de falsos positivos generados por reacciones cruzadas, pero generalmente no arroja resultados positivos en casos agudos (Raoult et al., 1989).

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. Esta prueba es capaz de detectar anticuerpos contra *R. rickettsii*, sólo requiere de una concentración de 0.5 µg/mL de antígeno para detectarlos y cuando son antígenos purificados son detectados en diluciones de hasta 1/10,000, existen dos tipos de ELISA para esta enfermedad la que detecta anticuerpos IgM y la que detecta anticuerpos IgG. Los anticuerpos IgM son detectados a la semana pos-infección, a la cuarta semana es cuando se detecta el mayor número de anticuerpos y se pueden detectar hasta la semana 33. Los anticuerpos IgG son detectables a la primera semana post-infección y siguen detectables hasta la semana 66 post-infección (Clements et al., 1983). La sensibilidad y especificidad de esta prueba por lo general es baja del 78% y 80% respectivamente (Anaya y Móron, 2007), aunque esto depende del tipo de antígeno que se fije en la placa por ejemplo otra prueba en la que utilizaron antígenos más específicos como con LPS (lipopolisacaridos de membrana) con costos elevados y donde se reportan 100% de sensibilidad y 87.5% de especificidad (Jones et al., 1993).

Western blot. Es una herramienta sero-epidemiológica poderosa para el diagnóstico y la confirmación de otras pruebas convencionales usadas para el diagnóstico de la FMMR. La gran ventaja de esta prueba a comparación de las otras pruebas es que esta es especialmente útil para diferenciar verdaderos positivos de falsos positivos creados por reacciones cruzadas de anticuerpos. Estas reacciones cruzadas son observadas entre biogrupos (grupo de las fiebres manchadas y del grupo Typhus) y entre especies, ya que actúa

directamente contra lipopolisacádidos (LPS) y es de clase IgM, sin embargo los anticuerpos IgG actúan directamente contra LPS y proteínas antigénicas (Raoult, D., y G. A. Dasch., 1995). Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba son 97% y 100% (para IgM) y de 89% y 98% (para IgG) respectivamente.

Figura 2. Métodos de diagnóstico de rickettsiosis de acuerdo a la fase de la enfermedad.



MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Estudio en humanos

Diseño del estudio. El diseño del estudio fue observacional descriptivo seccional cruzado, el cuál incluyó muestras de humanos que acudieron a uno de los 3 laboratorios clínicos de diagnóstico privados de la zona urbana de Ensenada, Baja California. Los análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

Consideraciones éticas y criterios de inclusión. Este estudio cumplió con los lineamientos que en materia de investigación y ética se establecen en la declaración de Helsinki (1964), revisada en Tokio, 1975, Venecia, 1983; y Hong Kong, 1989. Participaron en el estudio humanos mayores de 1 año de edad, sin distinción de sexo, que acudieron al laboratorio clínico de diagnóstico, por cualquier motivo; en el caso de niños, los padres y/o tutores autorizaron su participación en el estudio.

Cálculo del tamaño de muestra. El tamaño de la muestra se obtuvo en base al diseño de muestreo por atributos (Cochran, 1971). Debido a que se desconocía el valor de varianza, se consideró el valor de varianza máxima de 0.5 en la aplicación de la fórmula:

$$n = \pi (1 - \pi) \left[\frac{Z}{d} \right]^2 \quad (\text{Devore y Peck, 2001})$$

donde:

n = tamaño de muestra, resultando 384

π = estimador de varianza máxima 0.5

Z = 1.96 obtenido de tablas

d = precisión del 5 %

Toma de muestras: El procedimiento para la toma, procesamiento, identificación y conservación de muestras de sangre se realizó de la siguiente manera: se recolectó al menos 2 ml de sangre en tubos al vacío sin etilendiamino tetraacético (EDTA) de 3 ml destinado para las pruebas serológicas, por punción venosa radial cubital previa antisepsia de la región con alcohol isopropílico. Las muestras sanguíneas colectadas fueron identificadas con números correspondientes al cuestionario aplicado a cada sujeto, las contenidas en tubos sin EDTA fueron centrifugadas a 3500 RPM durante 10 minutos para obtener el suero para la realización de la prueba de ELISA e IFA. El suero obtenido de cada muestra fue depositado en contenedores de 1.5 ml de capacidad, identificado y almacenado a -20°C hasta el momento de realizar las pruebas serológicas.

Análisis serológico. Las muestras fueron colectadas por personal adscrito al laboratorio clínico correspondiente. Los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit *R. rickettsii* ELISA[®] Helica Biosystems, Inc., el cual detecta y semicuantifica IgG en perros, con una sensibilidad y especificidad de 99.5 y 96% respectivamente. Este kit se adaptó para uso en humanos utilizando un conjugado anti-IgG humana a una dilución de 1:40,000. Para determinar la sensibilidad y la especificidad en humanos se sometieron 30 muestras a IFA por ser ésta la prueba de oro en cuanto a diagnóstico

serológico se refiere, y se utilizó el estadístico kappa para medir la concordancia entre los resultados de IFA y ELISA. La interpretación del estadístico kappa se basó en los criterios de Landis J.R y Koch G.G (1977).

La dilución de los sueros sanguíneos utilizada fue de 1:100 con PBS (solución amortiguadora de fosfato). El valor de corte se obtuvo con el promedio de 20 sueros de sujetos de la región clínicamente sanos y sin historia de signos clínicos compatibles con rickettsiosis y de mordeduras de garrapata más 2 desviaciones estándar (Halle y Dash, 1980). De acuerdo a lo anterior el valor del punto de corte fue de 0.569 densidad óptica, como controles positivos se utilizaron dos sueros uno declarado positivo por el laboratorio de parasitología del departamento de medicina veterinaria preventiva y salud animal de la Universidad de Sao Paulo y el otro donado por ISESALUD declarado positivo por el INDRE.

Los sueros que resultaron positivos a ELISA fueron probados con IFA además se incluyeron 20 de los seronegativos. Las placas de IFA fueron producidas en el laboratorio de parasitología del departamento de medicina veterinaria preventiva y salud animal de la Universidad de Sao Paulo. Utilizando antígenos crudos derivados de *Rickettsias* aisladas en Brasil (*Rickettsia rickettsii* extraída de cuyos) como se describe previamente (Labruna et al., 2007) Cada suero fue diluido con PBS (phosphate-buffer saline), empezando la dilución a 1:64. Se utilizó el FITC conjugado anti-IgG humana (SIGMA) a una dilución de 1:1000.

Factores de riesgo y manifestaciones clínicas. Para la evaluación de los factores de riesgo y las manifestaciones clínicas asociadas a la seropositividad a rickettsiosis, se aplicó un cuestionario a los sujetos en el momento de la toma de muestra sanguínea (Anexo 1), se consideraron como sospechosos de la enfermedad a los sujetos que declararan haber presentando al menos cuatro de las siguientes manifestaciones clínicas: fiebre, eritema, epistaxis, cefalea, vómito, edema y/o haber sido mordido por una garrapata.

Análisis estadístico. Se diseñó una base de datos utilizando el programa EXCEL[®] (Microsoft) para la captura y manejo de información generada en este proyecto. La base de datos fue integrado por 2 archivos con la siguiente información: 1) resultados de los análisis serológicos en humanos; y 2) resultados de los cuestionarios epidemiológicos y signos clínicos.

El valor de seroprevalencia se generó como:

$$\% \text{ prevalencia} = \frac{\text{número de reactivos positivos}}{\text{número total en el grupo}} \times 100$$

La prevalencia ajustada se generó de aplicar la ecuación descrita por Greiner y Gardner, 2000.

Hipótesis alternativas en el estudio:

1. El valor calculado de seroprevalencia es distinto de cero.
2. El valor calculado de seroprevalencia es diferente por sexo, por grupos de edad y por ocupación del paciente.
3. Existe asociación entre los factores de riesgo con los resultados seropositivos a rickettsiosis.

4. La existencia de concordancia aunado a valores superiores del 80% en los porcentajes de sensibilidad y especificidad del kit de ELISA modificado a humanos con respecto a los resultados por IFA (estándar de oro), sugiere su utilización como prueba tamiz.

Las hipótesis nulas 1 y 2 se evaluaron con el estadístico Z de análisis de proporciones (una proporción y comparación entre dos proporciones). La hipótesis nula 3 se evaluó con OR (razón de desigualdad).

Los valores de sensibilidad y especificidad para probar la hipótesis nula 4, fueron calculados de acuerdo a la siguiente tabla de contingencia:

Estándar de oro (IFA)

		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positiva	(a)	(b)	(a+b)
	Negativa	(c)	(d)	(c+d)
	Total	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

$$Se = \frac{a \text{ (positivos)}}{a \text{ (positivos)} + c \text{ (falsospositivos)}}$$

$$Sp = \frac{d \text{ (negativos)}}{d \text{ (negativos)} + b \text{ (falsosnegativos)}}$$

En la evaluación de concordancia se utilizó el estadístico kappa.

Se utilizaron los siguientes procedimientos del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) para Windows ver 6.12 (SAS, 1990) por hipótesis nula (H_0) a evaluar:

Ho 1 y 2: El estadístico Z se calculo en una hoja de calculo.

Ho 3: Procedimiento FREQ, en el análisis de tablas de contingencia 2x2. Se obtuvieron estimadores OR (razón de desigualdad) puntual y por intervalo al 95%.

Ho 4: Procedimiento FREQ, en el análisis de tablas de contingencia 2x2. En la evaluación de existencia de concordancia se solicitó mostrara el valor del estadístico Kappa (agree/test).

2.- Estudio piloto en perros y garrapatas

Marco muestral del área de estudio. Este estudio se realizó durante el periodo Octubre-Noviembre del 2010, se incluyeron 20 muestras de perros capturados por el antirrábico de la ciudad de Ensenada así como 20 perros que acudieron a consulta a una de las dos clínicas veterinarias que participaron en el estudio.

Toma de muestras. Los criterios de elegibilidad fueron perros de al menos un mes de edad, sin importar sexo, talla ni raza. Los perros que fueron seleccionados mostraban signos clínicos de la enfermedad como: letargia, anorexia, depresión o claudicación. A estos se les tomó una muestra sanguínea de la región venocefálica de 3 ml, 1.5 ml de sangre se colocaron en un tubo con vacio y el resto se coloco en un tubo con EDTA. Todos los perros fueron examinados para localizar garrapatas en las siguientes regiones: cara, orejas, cuello, dorso, y en las extremidades (espacios interdigitales). La colecta de las garrapatas se realizó por un Médico Veterinario, siguiendo los procedimientos previamente descritos (Farley, 1996; Lyon y Restifo, 2000). Los

tubos de 12 ml con tapadera hermética, colectores de garrapatas, fueron enviados al laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, donde se conservaron en congelación a -80°C hasta el momento de la identificación taxonómica, la cual se realizó bajo observación estereoscópica (Quiroz, 1999).

Análisis serológico. Para la elaboración del diagnóstico serológico los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit comercial *R. rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., el cual detecta y semicuantifica IgG en perros, con una sensibilidad y especificidad de 99.5 y 96% respectivamente. La densidad óptica (DO) fue determinada a 450 nm, las muestras fueron analizadas en un lector de ELISA utilizando un filtro de 450 nm. Con los resultados obtenidos se estimó la seroprevalencia ajustada descrita por Greiner y Gardner, 2000.

Caracterización molecular de *Rickettsia rickettsii* en perros y garrapatas. Las muestras sanguíneas se enviaron y procesaron en el laboratorio de Salud Pública Veterinaria del IICV. El procesamiento de la muestra se llevó a cabo de la siguiente manera: las muestras de sangre sin EDTA se centrifugaron a 3500 RPM durante 5 minutos, se extrajo el suero sanguíneo de éstas y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml los cuales se conservaron hasta que se realizó el diagnóstico serológico. Las muestras con EDTA también se conservaron a -20°C hasta que se realizó la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras de sangre con EDTA y de las muestras de garrapatas, se utilizó el kit comercial Qiagen, siguiendo el protocolo del fabricante. Se corroboró la existencia de ADN por medio de electroforesis. Se utilizó como blanco un fragmento del gen codificante de la citrato sintasa (*gltA*). El producto del PCR de (*gltA*) con un tamaño de 401 pares de bases (pb), con los siguientes iniciadores:

CS-78 GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT

CS-323 GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT

Las condiciones del PCR fueron: al inicio, un calentamiento de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización de 95°C por 15 s, hibridación de 52°C por 30 s y extensión de 72°C por 30 min. Después de los 40 ciclos, se hizo una extensión adicional de 72°C por 7 min. Los productos de amplificación del PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE 1X conteniendo Gr safe. Para prevenir la contaminación de las muestras, las preparaciones, la extracción del ADN, la amplificación y la detección de productos de PCR fueron realizados en diferentes áreas de laboratorio (Chang et al., 2000). Una vez detectados los productos de PCR se enviaron a secuenciar al Laboratorio Eurofins MWG Operon Huntsville, Alabama, EUA. La secuencia se analizó en el programa Blast para obtener el porcentaje de homología con *R. rickettsii*.

RESULTADOS

1.- Estudio en humanos

El valor generado de seroprevalencia en este estudio fue mayor que cero ($P < 0.05$).

La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis por *R. rickettsii* fue de 3.9% (95% IC 0.8-5.3). Este resultado se obtuvo mediante la utilización del kit comercial estandarizado para su uso en humanos. De la totalidad de pacientes incluidos en el estudio, el 12.7% (49/384) se consideraron sospechosos de la enfermedad por presentar al menos 4 de las siguientes manifestaciones clínicas: fiebre, eritema, epistaxis, cefalea, vómito, edema y/o haber sido mordido por una garrapata.

El valor generado de seroprevalencia en hombres y mujeres no fue diferente ($P > 0.05$), así como también entre grupos de edad y ocupación.

La seroprevalencia ajustada a rickettsiosis no mostró en este estudio distribución similar ($P > 0.05$) entre las clases de sexo, grupos de edad, y grupos de ocupación.

No se observó asociación ($P > 0.05$) entre los factores de riesgo a evaluar con los resultados seropositivos a rickettsiosis.

Evaluación de la asociación de signos clínicos con la seropositividad a rickettsiosis.

No hubo asociación ($P > 0.05$) con claudicación, problemas nerviosos, transfusiones sanguíneas, ser mordido por garrapatas, sin embargo el siguiente grupo de manifestaciones clínicas: epistaxis, vómito, artralgia,

mialgias mostraron asociación significativa ($P < 0.05$) con los pacientes seropositivos (cuadro 1).

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas asociadas a la seropositividad de rickettsiosis.

Manifestaciones clínicas asociadas	OR	IC 95%
Epistaxis	4.6	1.17-18.17
Vómito	3.5	1.10-11.21
Mialgias	3.5	1.28-11.43
Artralgias	4.3	1.26-15.23

OR: razón de momios.

IC: Intervalos de confianza.

$P < 0.5$.

Prueba de concordancia entre los resultados de ELISA (modificado para su uso en humanos) con los resultados de IFA.

Los valores de sensibilidad y especificidad generados del kit comercial *R. rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., modificado para su uso en humanos fueron del 84% y 94% respectivamente. Al confrontar los resultados de la ELISA con los resultados de la utilización de IFA (Figura 3) a través del estadístico kappa, se generó un valor de 0.80 diferente de cero ($P < 0.05$) y cuya magnitud la ubican como superior, alto o según Landis J.R y Koch G.G (1977) de acuerdo sustancial.

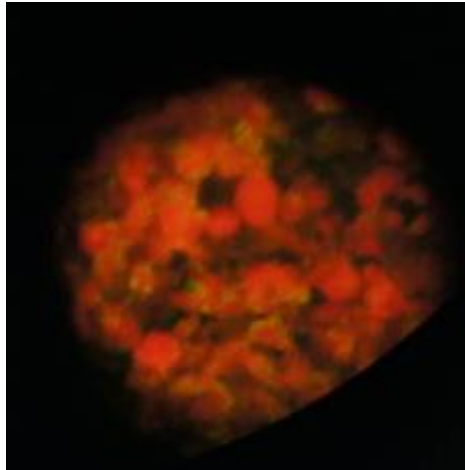


Figura 3. Resultado positivo a riquetsiosis, de la aplicación de la técnica de Inmunoflorescencia indirecta.

2.- Estudio piloto en perros y garrapatas

Análisis serológico en perros.

La seroprevalencia general del estudio piloto realizado en perros fue del 66% la cual se desglosa de acuerdo a la procedencia de los perros en el (Cuadro 2).

Cuadro 2. Perros positivos a riquetsiosis por ELISA de la ciudad Ensenada.

Procedencia	n	Seroprevalencia
General	30	63%
Centro Antirrábico	20	75%
Clínicas Veterinarias	10	40%

Caracterización molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas.

El resultado del análisis de electroforesis aplicado a muestras de ADN de perro y garrapata se observa en la Figura 4.

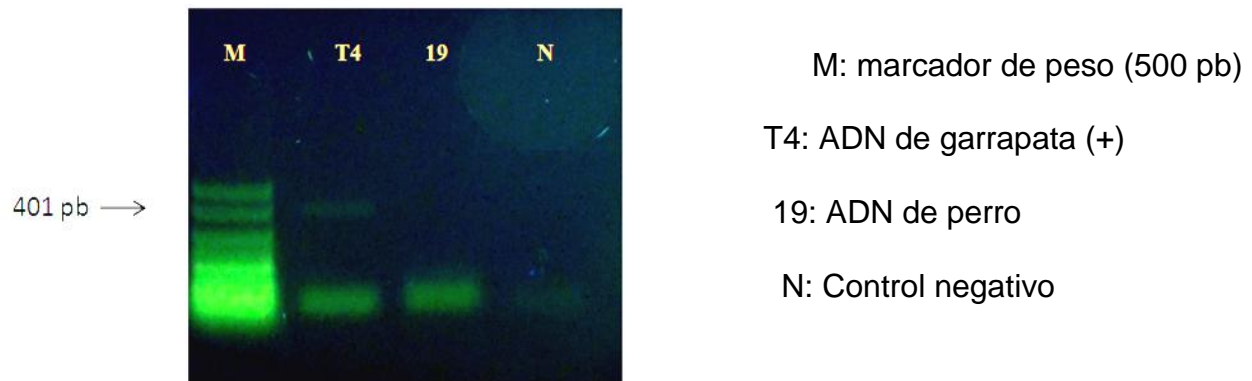


Figura 4. Análisis de la electroforesis en gel de productos de PCR para *R. rickettsii* de muestra de sangre de perro y de garrapata.

La secuenciación del producto del PCR de la muestra T4 se presenta en la Figura 5, mientras que la secuenciación para la muestra 19 en la Figura 6. Las homologías generadas de aplicar el programa BLAST se señalan en cada una de las figuras, resaltando que en ambas se obtuvieron valores de homología con *R. rickettsii* del 100 y 99% respectivamente.

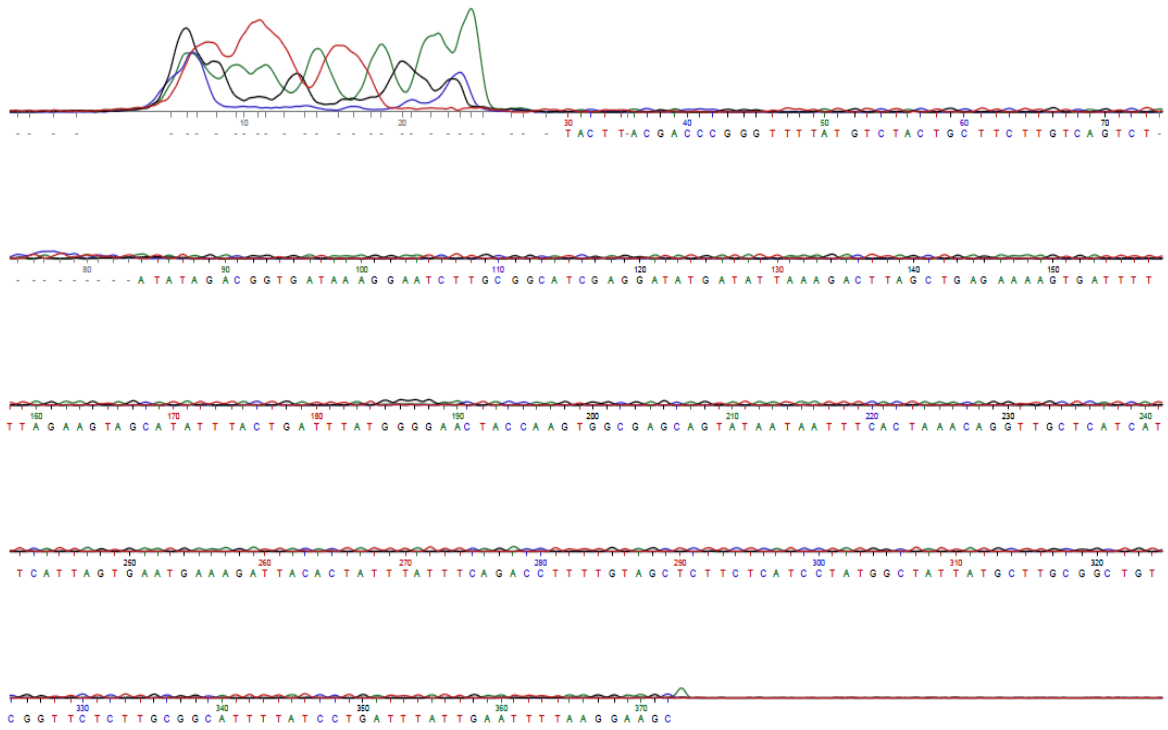


Figura 5. Cromatograma de la secuenciación de un segmento de 401 pb de *gltA* de *R. rickettsii* del producto del PCR de un perros en Ensenada B.C., México, mostrando una homología del 100% con *R. rickettsii* (número de acceso del Genbank CP000766.2).

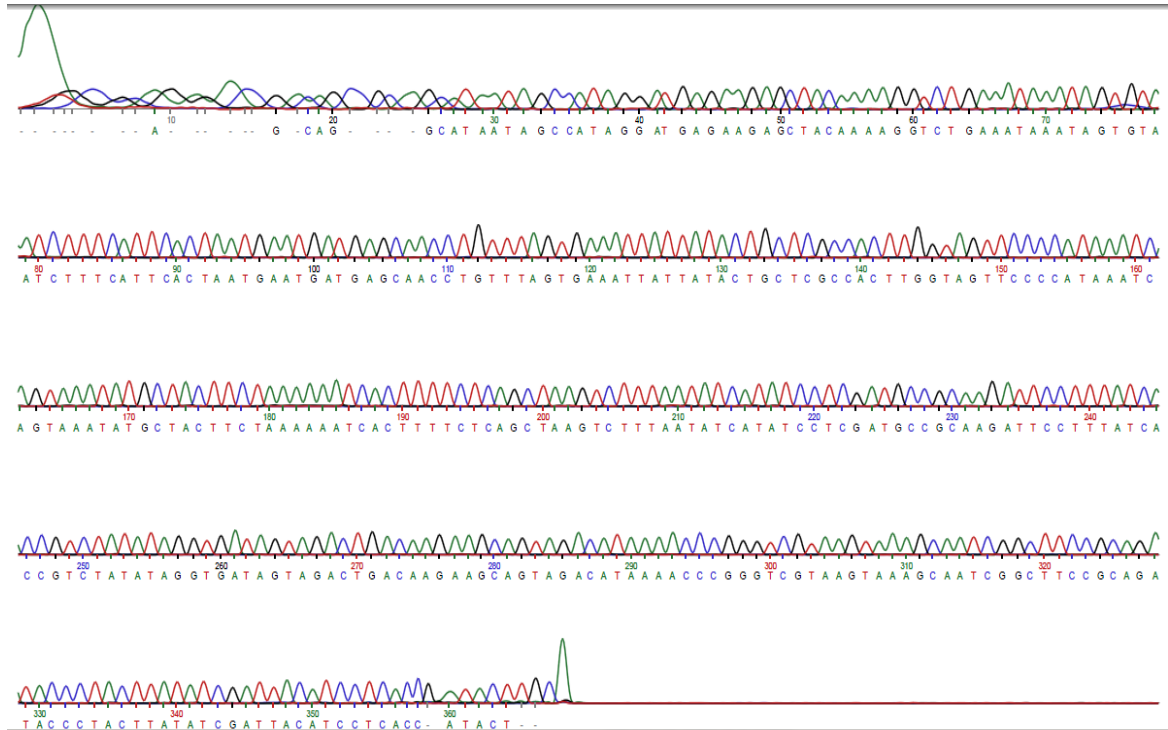


Figura 6. Cartograma de la secuenciación de un segmento de 401 pb de *gltA* de *R. rickettsii* del producto del PCR de una garrapata identificada morfológicamente como *R. sanguineus* de Ensenada B.C., México, mostrando una homología del 99% con *R. rickettsii* (número de acceso del Genbank CP000766.2).

DISCUSIONES

La seroprevalencia de rickettsiosis ha sido previamente evaluada en humanos y animales en diversos lugares del mundo con diferentes técnicas de diagnóstico, participando varios vectores y condiciones particulares de sujetos de estudio (Sato et al., 2001; Elchos y Goddard., 2003; Labruna et al., 2004; Zavala et al., 2008). Sin embargo, no existen publicaciones donde la seroprevalencia para rickettsiosis haya sido estimada utilizando ELISA incluyendo en el mismo estudio humanos y perros y donde el único vector en el área sea *R. sanguineus*.

La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis (*R. rickettsii*) en humanos obtenida en este trabajo fue del 3.9% (IC 95%,0.8-5.3), mayor al resultado de Zavala y colaboradores en Yucatán con 0.5% (2/390) tomando en cuenta que estuvieron presentes los vectores *A. cajennense* y *R. sanguineus*, además se identificó la bacteria por PCR (Zavala et al., 1999); similar a la obtenida por Pinter y colaboradores en el 2008 en una zona de Brasil, presentaron una seroprevalencia del 2.8% en humanos donde el vector fue *A. aureolatum* y diagnosticada por IFA. La diferencia en cuanto a los valores de seroprevalencias pudieran deberse a la presencia de otras especies rickettsiales y a la existencia de otros hospederos de garrapatas como lo son el gambá (zarigüeya) y el capibara en Brasil.

Graf et al. (2007) reportaron un valor de seroprevalencia del 6% en humanos empleando ELISA y muestreando un total de 10,000 sujetos de

diversas localizaciones en los Estados Unidos, sin importar la presencia de signos clínicos de la enfermedad.

La seroprevalencia con mayor valor en humanos, reportada hasta el momento en Centro y Suramérica, fue la obtenida por Hidalgo y colaboradores (2007) en Colombia, la cual fue del 40.3% empleando IFA. Los sujetos que participaron en el estudio no mostraron signos clínicos de la enfermedad, sin embargo pudieron haberlos presentando con anterioridad al muestreo. Los autores explican que la alta seroprevalencia registrada pudo deberse a reacciones cruzadas con otras riquetsias. Situación diferente a la del presente estudio, en el cual la baja seroprevalencia comparada con este estudio pudo deberse a que la técnica diagnóstica (ELISA) utilizada fue más específica y por lo tanto disminuye las reacciones cruzadas entre especies riquetsiales. Además en Colombia se han reportado tres vectores *A. cajennense*, *R. sanguineus*, y *Dermacentor nitens*, aumentando las probabilidades de transmisión al humano.

Los signos clínicos observados con frecuencia en pacientes que cursan o que han cursado por la enfermedad incluyen fiebre alta, dolor de cabeza y dolor muscular; pueden a menudo ser acompañados por náusea, vómito, exantema, dolor abdominal, desórdenes respiratorios y coagulopatías. Sin embargo es difícil realizar su diagnóstico clínico por ser una enfermedad heterogénea en sus presentaciones y que incluso puede confundirse con infecciones virales (Dirk y Elson, 2005). La mayoría de los pacientes no presenta la clásica triada que corresponde a fiebre, exantema e historia de

mordedura de garrapata al inicio. (CDC., 2003). Existen estudios donde se describe la signología clínica en pacientes durante el curso de la enfermedad por ejemplo, en pacientes hospitalizados a causa de riquetsiosis el 100% (9) presentaron fiebre y el 88% (8) declaró haber tenido vómito, (Zavala et al., 2008) al igual que en el caso anterior el 100% (115) de los niños atendidos en el hospital infantil de la Comarca Lagunera, presentaron fiebre, además de exantema; por otra parte se presentaron cefalea y mialgias en el 70% de los casos (De Lara Huerta y Cárdenas Barragán 2008). Signología similar se presentó durante la fase de convalecencia en pacientes que murieron a causa de riquetsiosis en Mexicali B.C. en el año 2011, donde se observó fiebre en el 100% (13) de los convalecientes, así como vómito en el 75%, mialgias y artralgias en el 62%, y sólo el 14% presentó epistaxis (Bustamante y Pon 2011). Los signos clínicos de esta enfermedad son inespecíficos, por ello es complicado el diagnóstico clínico.

En el presente trabajo sólo el 25% (3/12) de los seropositivos declararon haber presentado fiebre meses antes o durante el muestreo, el 50% de los seropositivos declaró haber padecido de mialgias, artralgias y vómito, cefalea en el 66%, dolor abdominal en el 41%, es importante considerar que los pacientes seropositivos pudieron haber cursado la enfermedad hasta por más de un año de anterioridad ya que los anticuerpos IgG pueden permanecer por 66 semanas post infección. Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar la existencia de asociación de seropositividad a riquetsiosis con algunos factores de riesgo de la enfermedad así como a signos clínicos de la

misma. De ellos, el vómito, epistaxis, artralgia y mialgias resultaron con asociación, sin embargo estos signos no son específicos de ésta enfermedad pueden observarse en diversas patologías. Las mialgias y artralgias perduran por meses hasta años en algunos pacientes que han padecido la enfermedad, por lo tanto estos signos no pueden considerarse como indicativos de la enfermedad.

Existe controversia en cuanto a la definición de la mejor técnica diagnóstica en estudio de seroprevalencia en rickettsiosis, básicamente entre ELISA e IFA aunque ésta última es considerada como la prueba de oro para el diagnóstico serológico de las enfermedades rickettsiales en humanos y animales (Pinter et al., 2008). ELISA ha sido una herramienta utilizada como método diagnóstico desde 1983 (Clements et al., 1983), sin embargo la eficiencia de estas pruebas depende en gran medida de los anticuerpos indirectos que se utilicen, por ejemplo existen IFAs que tienen la capacidad de medir IgG e IgM en la misma muestra al mismo tiempo, lo que no sucede con ELISA ya que sólo tiene la capacidad de medir IgG o IgM según sea el caso.

La alta especificidad (94%) del kit comercial de *R. rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., modificado para su uso en humanos pueden deberse a la calidad del antígeno fijado en las placas del kit ya que la sensibilidad y la especificidad de ELISA dependerá de la calidad del antígeno que se fije en la placa, existen unos lipopolisacaridos específicos (Jones et al., 1993) de la capa externa de la bacteria (*R. rickettsii*) que se han utilizado como antígeno para las placas de ELISA, esto ha aumentado la especificidad de ELISA y con ello su

valor económico. La sensibilidad moderada (84%) y puede deberse al alto valor del punto de cohorte.

Clements y colaboradores (1983) al comparar la sensibilidad y especificidad de ELISA e IFA utilizando antígenos extraídos de cultivos de *R. rickettsii* en embrión de pollo, obtuvieron 100% de sensibilidad y de especificidad por ELISA, mientras que IFA mostró un 83% de sensibilidad y un 100% de especificidad. En otro estudio realizado por Anaya y colaboradores en el 2007 utilizando IgM obtuvieron por ELISA 78% de sensibilidad y 80% de especificidad, mientras que con IFA un 82% de sensibilidad y un 90.9% de especificidad. Como antígeno para la realización de las placas de ELISA utilizaron un lisado total del referencial *R. rickettsii*, cepa *Kaplan* y para la prueba IFA fueron células Vero infectadas con *R. rickettsii* cepa *Kaplan*.

Con el resultado de 0.80 para el estadístico kappa entre ELISA y la prueba confirmatoria (IFA) se traduce a una alta confiabilidad en el uso de modificación del Kit comercial ELISA modificado para su uso en humanos en el diagnóstico de la enfermedad. La alta concordancia entre ambas pruebas puede deberse a que ambas detectan IgG aunque una emita fluorescencia y la otra cambios colorimétricos (Anaya et al., 2007).

El principal objetivo del muestreo de perros de la ciudad de Ensenada fue la identificación molecular de la bacteria *R. rickettsii*. Como primer paso se realizó ELISA a las muestras y se obtuvo una seroprevalencia general del 63% (19/30), valor alto comparado con los resultados de estudios similares. En todos ellos los perros presentaron signos clínicos de la enfermedad, además

de encontrarse infestados por garrapatas. Romano y colaboradores en 1998, reportaron 16% de seropositivos, a rickettsiosis, Rodgers y colaboradores (1989) una seroprevalencia del 38%. La diferencia entre las seroprevalencias pudiera deberse a modificaciones climatológicas, algunos investigadores sugieren que las garrapatas han modificado su comportamiento alimenticio y reproductivo a causa del aumento de las temperaturas en los últimos años, ocasionando un incremento en la población de garrapatas (Parola y Raoult 2001).

La identificación molecular de la bacteria en perros se realizó utilizando sólo una muestra positiva, debido a la dificultad de la localización de la rickettsia en el torrente sanguíneo, ya que sólo es detectable en sangre por un lapso de 8 días cuando es inoculada por la garrapata (Piranda et al., 2008). El producto del PCR de la muestra de perro positiva se secuenció y se alineó, obteniendo como resultado una homología del 100% con *R. rickettsii*.

El vector de *R. rickettsii* presente en el área donde se realizó éste estudio fue *R. sanguineus* según la identificación taxonómica que se realizó bajo observación estereoscópica. El principal hospedador de *R. sanguineus* son los perros, como hospederos secundarios se citan a los conejos, roedores, palomas, carnívoros salvajes y al humano (Dantas-Torres, 2007), esto pudiera explicar las altas seroprevalencias de rickettsiosis reportadas en perros a comparación con las registradas en humanos. Tomando en cuenta que *R. sanguineus* es capaz de transmitir no sólo *R. rickettsii* sino también *R. conorii* (Moraes-Filho et al., 2008), con los resultados moleculares de este estudio

tanto en perros como en garrapatas, se sugiere que la presencia de anticuerpos en perro y humanos respondieron exclusivamente a *R. rickettsii*.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio se demostró que existe evidencia serológica de rickettsiosis en humanos y perros de la Cd. de Ensenada, por lo tanto debe incluirse en los diagnósticos diferenciales del sector salud, por ser una enfermedad de curso corto y con un valor de mortalidad del 30% en pacientes no tratados.

El diagnóstico serológico de esta enfermedad puede realizarse por medio de ELISA, la cual es una técnica confiable, rápida y fácil de realizar, por los valores de concordancia que generaron respecto a IFA.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son inespecíficas, además son difíciles de evaluar en estudios de seroprevalencia ya que éstos se presentan en las primeras dos semanas post-infección generalmente y los anticuerpos son detectables en sangre hasta por 66 semanas.

Los valores de seroprevalencia obtenidos en perros fueron superiores al 60% sugiriendo la necesidad de desarrollar programas preventivos en el control de la garrapata por ser estas las portadoras de la enfermedad.

Implicaciones

Se hace necesaria mayor interacción entre los cuerpos colegiados expertos en el área de salud pública y las autoridades: del sector salud y de salud animal (Secretaría de Salud y SAGARPA). Así mismo promover programas de educación para la prevención de enfermedades zoonóticas.

Es necesario realizar un estudio que incluya la distribución y frecuencia de esta enfermedad en la Cd. de Ensenada, que permita medir los factores de riesgo.

LITERATURA CITADA

- Anaya E., C. Morón, P. Arias Johann Chauca, R. Román, Evaluación de pruebas de elisa e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra rickettsiosis Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2007; 25(3):336-39.
- Anaya R. E., C. Morón., P. Arias., J. Chauca., y R. Román. 2007. Serodiagnóstico de rickettsiosis por prueba ELISA e IFI. Ministerio de salud Instituto Nacional de Salud Cendro de información y documentación científica. 36 Vol. 7 pp 320-344.
- Brouqui P, F. Bacellar, G. Baranton, R. J. Birtles, A. Bjoersdorff, J. R. Blanco, G. Caruso, M. Cinco, P. E. Fournier, E. Francavilla, M. Jensenius, J. Kazar, H. Laferl, A. Lakos, S. Lotric Furlan, M. Maurin, J. A. Oteo, P. Parola, C. Perez-Eid, O. Peter, D. Postic, D. Raoult, A. Tellez, Y. Tselentis y B. Wilske. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. 2004. Clin Microbiol Infect; 10: 1108–1132.
- Bustamante ME, Varela G. 1947. Distribución de las rickettsias en México. Rev Inst Salubr Enferm Trop; 8:3-14.
- Bustamante M. J. y Pon M. A. 2011. Boletín 130. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 7 Vol. 27 (7).
- Chang Y.F., V. Novosol, S.P. McDonough., C.F. Chang., R.H. Jacobson, T. Divers., F.W. Sihn, D.H. Lein. 2000. Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to *Ixodes* Ticks. Vet Pathol 37, 68-76.
- Centers for Disease Control y Prevention (CDC). Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in family clusters—three states. 2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 21;53(19):407-10.
- Clements M. L., J. S. Dumler, P. Fiset, C. L. Wisseman, M. J. Snyder y M. M. Levine. 1983. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: Comparison of IgM y IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays y Indirect Fluorescent Antibody Test. The Journal of infectious disease vol 148, No. 5.
- Cochran, William G. Técnicas de Muestreo. 1977. México D.F. CECSA.
- Dantas-Torres F: The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. Vet Parasitol 2008, 152:173-185.
- De Lara Huerta J. y R. Cárdenas Barragán. 2008. Fiebre manchada de las montañas rocosas en pediatría Revisión clínica de una serie de 115 caso. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría Vol. XXII Núm. 85.
- Demma LJ, D., Marc S. Traeger, William L. Nicholson, Christopher D. Paddock, Dianna M. Blau, Marina E. Ereemeeva, Gregory A. Dasch,

- Michael L. Levin, Joseph Singleton, Jr., B.S., Sherif R. Zaki, James E. Cheek, David L. Swerdlow, and Jennifer H. McQuiston. 2005. Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. *The new england journal of medicine*. 356;6.
- Demma LJ, M. Traeger, D. Blau, R. Gordon, B. Johnson, J. Dickson, R. Ethelbah, S. Piontkowski, C. Levy, W.L. Nicholson, C. Duncan, K. Heath, J. Cheek, D. L. Swerdlow, J. H. McQuiston. 2006. Serologic evidence for exposure to *Rickettsia rickettsii* in eastern Arizona and recent emergence of Rocky Mountain spotted fever in this region. *Vector Borne Zoonotic Dis*;6(4):423-9.
- Devore, J. y Peck, R. (2001), *Statistics The Exploration y Analysis of Data*, Ed. 4, Duxbury Press.
- Dumler JS y Walker DH. 2005. Rocky Mountain spotted fever changing ecology y persisting virulence. *N Engl J Med*; 353(6):551-3.
- Elchos BN y J Goddard. 2003. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs y their owner. *J Am Vet Med Assoc*. 223(10):1450-2, 1433.
- Elston DM. Rickettsial skin disease: uncommon presentations. *Clin Dermatol*. 2005;23(6):541-4.
- Eremeeva M.E., G.A. Dasch, D.J. Silverman. 2001. Quantitative Anayses of Variations in the Injury of Endothelial Cells Elicited by 11 Isolates of *Rickettsia rickettsii*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 8, 788-796.
- Estripeaut D, M. G. Aramburú, X. Sáez-Llorens, H. A. Thompson, G. A. Dasch, C.D. Paddock, S. Zaki, M.E. Eremeeva. Rocky Mountain spotted fever, Panama. 2007. *Emerg Infect Dis*;13(11):1763-5.
- Farley D. 1996. Fighting Fleas y Ticks. Preventing Tick-Borne Disease. FDA consumer magazine.
- Foley J., N. Drazenovich, M. Leutenegger, B. Chomel. 2007. Association between poyarthritis y thrombocytopenia y increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. *Veterinary Record*; 160:159-162.
- Graf Paul C. F, Jean-Paul Chretien, Lady Ung, Joel C. Gaydos y Allen L. Richards. 2007. Prevalence of Seropositivity to Spotted Fever Group Rickettsiae y *Anaplasma phagocytophilum* in a Large, Demographically Diverse US Sample. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:70–7.
- Galvao, M.A., J.A. Lamounier, E. Bonomo, M. S. Tropaia, E.G. Rezende, S.B. Calic, C.B. Chamone, M.C. Machado, M. E. Otoni, R.C. Leite, C. Caram, C.L. Mafra, D.H. Walker, , 2002, Emerging y reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica* 18, 1593-1597.

- Greiner M y I.A. Gardner. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med* 45, 43-59
- Halle S. y G. Dasch. 1980. Use of a Sensitive Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in a Retrospective Serological Analysis of a Laboratory Population at Risk to Infection with Typhus Group *Rickettsiae*. *Journal of clinical microbiology*. 12 Vol.3 (343-350).
- Hidalgo M. R. Sánchez, L. Orejuela, J. Hernández, D.H. Walker, y G. Valbuena. 2007. Prevalence of Antibodies Against Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Rural Area of Colombia. *The American Society of Tropical Medicine y Hygiene*. 77(2) pp. 378-380.
- Horta M. C., Marcelo B. Labruna, Luis A. Sangioni, Manoella C. B. Vianna, Solange M. Gennari, Márcio A. M. Galvão, Claudio L. Mafra, Odilon Vidotto, Teresinha T. S. Schumaker, David H. Walker 2004. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans y domestic animals in a brazilian spotted fever–endemic area in the state of saõ paulo, brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* y another spotted fever group rickettsia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 7, pp. 93–97.
- Jones D., Yerson B, Olson J., y Greene C. Enzyme - Linked immunosorbent Assay for Detection of Human Immunoglobulin G to Lipopolysaccharide of Spotted Fever Group *Rickettsiae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31(1): 138-141.
- Kim, C.M., Yi, Y.H., Yu, D.H., Lee, M.J., Cho, M.R., Desai, A.R., Shringi, S., Klein, T.A., Kim, H.C., Song, J.W., Baek, L.J., Chong, S.T., O'Guinn M, L., Lee, J.S., Lee, I.Y., Park, J.H., Foley, J., Chae, J.S., 2006, Tick-borne rickettsial pathogens in ticks y small mammals in Korea. *Applied y environmental microbiology* 72, 5766-5776.
- Karpathy SE., G. A. Dasch., M. E. Eremeeva. 2007. Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* using DNA sequencing variable intergenic regions, *J.Clin.Microbiol.*;45:2545-53.
- Kováčová, E., y J. Kazár, 2000, Rickettsial diseases and their serological diagnosis. *Clin. Lab*. 46, 239-245.
- Labruna M. B., T Whitworth, M. C. Horta, D. H. Bouyer, J.W. McBride, A. Pinter, V. Popov, S. M. Gennari., D. Walker. 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.
- Labruna, M.B., R.C. Pacheco, L.J. Richtzenhain, M.P.J. Szabo. 2007. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* y *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of Sao Paulo, Brazil. *Appl. Envir. Microbiol.* 73, 869-873.

- La Scola, B., Raoult, D., 1997, Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old y new rickettsial diseases. J. Clin. Microbiol. 35, 2715-2727.
- La Scola, B., S. Meconi, F. Fenollar, J. M. Rolain, V. Roux, D. Raoult. 2004. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. Int J Syst Evol Microbiol 52, 2035-2041.
- Lysis J.R. y Koch G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33:159-174.
- Marshall, G. S., G. G. Stout, R. F. Jacobs, G. E. Schutze, H. Paxton, S. C. Buckingham, J. P. DeVincenzo, M. A. Jackson, V. H. San Joaquin, S. M. Styart, C. R. Woods. 2003. Antibodies Reactive to *Rickettsia rickettsii* Among Children Living in the Southeast y South Central Regions of the United States. Arch Pediatr Adolesc Med 157, 443-448.
- Moraes-Filho Jonas, Arlei Marcili, Fernya A. Nieri-Bastos, Leonardo J. Richtzenhain, Marcelo B. Labruna. 2008. Genetic analysis belonging to *Rhipicephalus sanguineus* grup in Latin America. Acta Troica 117 (2011) 51-55.
- Parola P. y D. Raoult. 2001. Ticks y Tickborn Bacterial Diseases in Humans: An Emerging infectious Threat. Clinical infectious diseases. 32:897-928.
- Pierre E. y Raoult D. Sucide PCR on Skin Biopsy Specimens for Diagnosis of Rickettsioses. 2004. Journal of Clinical Microbiology; 48:3428-3434.
- Pinter, A., M. C. Horta. 2008. "Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs y humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of Sao Paulo, Brazil." Cad Saude Publica 24(2): 247-52.
- Pirya E. M., Joao Luis H Faccini, Adriano Pinter, Tais B. Saito, Richard C Pacheco, Mitika K Hagiwara, Marcelo B. Labruna. 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical y laboratory findings. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 103(7): 696-701.
- Quiroz, H., 1999, Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Ixódidos, Vol I, 1ra Edition. Editorial Limusa, México, D.F., 876 p.
- Raoult, D., y G. A. Dasch. Line blot y Western blot immunoassays for diagnosis of Mediterranean spotted fever. 1989. J. Clin. Microbiol. 27: 2073–2079.
- Raoult, D., y G. A. Dasch. Immunoblot cross-reactions among *Rickettsia*, *Proteus* spp. y *Legionella* spp. in patients with Mediterranean spotted fever. 1995. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 11:13–18.
- Raoult D., y P. Parola. 2007. Rickettsial diseases (1^{ra} Ed.) Informa healthcare. New York London.

- Regnery, R. L., C. L Spruill. y B. D. Plikaytis. 1991. Genotypic identification of rickettsiae y estimation of interspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 173, 1576–1589.
- Rodger Sandra J. Rebecca J. Morton, Charles A. Baldwin. 1989. A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma. *J Vet Diagn Invest* 1:154-159.
- Romano-Osuna, M., L. Tinoco-Gracia, F. Covarrubias-Pimentel. 1998. Demostración de *Ehrlichia canis* mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, B.C. *Revista AMMVEPE* 9, 86.
- Romano M. 2011. Estimación de la Prevalencia para Riquetsiosis (*Rickettsia rickettsii*) y su Asociación con Factores de Riesgo en Perros de Mexicali, Baja California. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California.
- Roux Veronique, Pierre-Edouard Fournier, Didier Raoult. 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. 1996. *Journal of clinical microbiology*. 34(9): 2058-2065.
- SAS, I.I., 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc Cary, NC.
- Satoh, H., A. Tsuneki. Seroprevalence of antibodies against spotted fever group rickettsia among dogs y humans in Okinawa, Japan. 2001. *Microbiol Immunol* 45(1): 85-7.
- Silverman, D.J. 1984, *Rickettsia rickettsii*- induced celular injury of human vascular endothelium in vitro. *Infect. Immun.* 44, 545-553.
- Stenos, J., S. R. Graves, N. B. Unsworth. 2005. A Highly sensitive y Specific Real-Time PCR Assay for the Detection of Spotted Fever y Typhus Group Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg* 73, 1083-1085.
- Tinoco G. L., H. Quiroz, M. M. T. Quintero, T. Rentería, Y. González-Medina, A. Barreras Serrano, S. Hori-Oshima, M. Moro, J. Vinasco. 2009. Prevalencia of *Rhipicephalus sanguineus* tick on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet Rec.* 164, 59-61.
- Tzianabos T., B. E. Yerson, J. E. McDade. 1989. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2866-2868.
- Vestris G., P. E. Rolain, M. L.Fournier, B. M. Enea., J. Y Patrice., D. Raoult. Seven years' Experience of isolation of *Rickettsia* spp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay. *Ann.N.Y.Sci.* 2003; 990:371-374.
- Walker, D.H., 1995, Rocky Mountain spotted fever: a seasonal alert. *Clin Infect Dis* 20, 1111-1117.
- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae) Cambridge University Press, Cambridge.

Cambridge University Press. A Guide to the Brown Ticks of the World.

Zavala-Velazquez J. E., Yu Xue-Jie y D. H. Walker. 1996. Unrecognized Spotted Fever Group Rickettsiosis Masquerading as Dengue Fever in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55 (2), pp. 157-159.

Zavala-Velazquez, J.E., Ruiz-Sosa, J., Vado-Solis, I., Billings, A.N., Walker, D.H. 1999. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatan: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. *Am J Trop Med Hyg* 61, 405-408.

ANEXO 1
ENFERMEDADES ZONÓTICAS TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS

PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO

CUESTIONARIO I

Fecha: (día/mes/año)	
Nombre:	
Afiliación (Seguro social):	
Colonia:	
Teléfono:	
Edad:	
Sexo:	F () M ()
Ocupación:	
Motivo de la consulta:	
¿Ha tenido fiebre en los últimos 6 meses?	Si () No ()
¿Ha presentado manchas rojas en la piel? ¿Hace cuanto tiempo? Y durante cuántos días?	Si () No ()
¿Ha sangrado por la nariz sin causa aparente?	Si () No ()
¿Ha presentado dolor de cabeza?	Si () No ()
¿Ha presentado dolores musculares? Dónde?	Si () No ()
¿Ha presentado dolor abdominal?	Si () No ()
¿Ha presentado náuseas, vómito o tos?	Si () No ()
¿Ha presentado problemas nerviosos (convulsiones, parálisis, coma, delirio)?	Si () No ()
¿Ha presentado hinchazón en extremidades?	Si () No ()
¿Ud. ha presentado dolores articulares?	Si () No ()
¿En qué extremidad(s)?:	BrazoL () BrazoD () PiernaL () PiernaD ()
¿Alguna vez ha recibido transfusión de sangre?	Si () No ()
¿Ha sido picado por garrapatas? Hace cuántos días?	Si () No () No. de días ()
¿En qué parte del cuerpo?	(1)cab, (2)cuello, (3)tórax, (4)abdm, (5)pelvis, (6)extrem (.111111)
¿Cuántas veces al año pasea al campo?	No. de veces al año ()
¿Cuántos perros hay en el hogar?	No. de perros ()

¿Cuántas veces al año baña con garrapaticida a su perro?	No. de veces al año ()
Nombre del garrapaticida:	
¿Cuántas veces al año desparasita contra garrapatas a su perro?	No. de veces al año ()
Nombre del desparasitante:	
¿Su perro(s) vive únicamente dentro de la casa?	Si () No ()
¿El patio de la casa es totalmente de cemento?:	Si () No ()
¿Entran y/o salen perros de su casa a la calle? :	Si () No ()
¿Cuántas veces al año fumiga su casa?	No. de veces al año ()

NOMBRE DEL ENCUESTADOR: _____

NÚMERO DE MUESTREO: .