

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**Instituto de Ciencias Agrícolas**  
**Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



**“TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES  
TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS”**

**TESIS**  
**COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**MCV ANGÉLICA MARÍA ESCÁRCEGA AVILA**

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

**SINODALES**  
**DR. ALBERTO BARRERAS SERRANO**  
**DRA. ADRIANA MORALES TREJO**  
**DRA. SAWAKO HORI**  
**DRA. BERTHA LANDEROS**

La presente tesis “**TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS**” realizada por el **C. Angélica María Escárcega Ávila**, dirigido por el **Dr. Luis Tinoco Gracia**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

## **Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular

---

Dr. Luis Tinoco Gracia  
Director de Tesis

---

Dr. Alberto Barreras Serrano  
Sinodal

---

Dra. Adriana Morales Trejo  
Sinodal

---

Dra. Sawako Hori  
Sinodal

---

Dra. Bertha Landeros  
Sinodal

## ÍNDICE

RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
ARTÍCULO 1. Rickettsiosis: seroprevalencia en humanos e identificación molecular de <i>Rickettsia rickettsii</i> en perros y garrapatas de Ensenada, Baja California, México .....	3
ARTÍCULO 2. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsiosis ( <i>Rickettsia rickettsii</i> ) en humanos de Ensenada, Baja California, México.....	21
ARTÍCULO 3. Detección de <i>Borrelia burgdorferi</i> en garrapatas, perros y humanos.....	38
CONCLUSIONES.....	51

## RESUMEN

Una gran cantidad de bacterias y parásitos transmitidos por garrapatas son considerados como patógenos de gran importancia, volviéndose un problema relevante para la salud pública ya que la mayoría de estos pueden infectar a humanos. En México existe información limitada en cuanto a la prevalencia de enfermedades transmitidas por garrapatas y patógenos zoonóticos en humanos, perros y garrapatas. En los estados del norte del país; Baja California y Sonora, se han documentado prevalencias de la garrapata café del perro, *Rhipicephalus Sanguineus*. En los estados del norte del país; Baja California y Sonora, se han documentado prevalencias de la garrapata café del perro, *Rhipicephalus Sanguineus* vector de varias enfermedades entre las que se destacan: *Ehrlichia canis*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, y *Rickettsia rickettsii*. La fiebre manchada de las montañas rocosas (FMRR) es causada por *Rickettsia rickettsii*, bacteria intracelular obligada, enfermedad zoonótica de gran importancia; por su alta mortalidad (hasta el 30% en pacientes no tratados a tiempo con antibióticos), por su signología inespecífica, por ser polisistémica y por su curso corto (12 días) Walker (1995).

Por lo tanto el objetivo de este estudio fue utilizar diferentes tipos de diagnóstico para detectar y caracterizar *Rickettsia rickettsii* y *Borrelia burgdorferi* en humanos, perros y garrapatas.

En el estudio descriptivo seccional cruzado, incluyó 384 muestras de humanos de Ensenada, Baja California. Los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit *R. rickettsii* ELISA<sup>®</sup> 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 molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas se utilizaron iniciadores específicos. La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis por *R. rickettsii* en humanos fue de 3.1% (95% IC 0.8-5.3). La sensibilidad y especificidad de la prueba modificada para su uso en humanos fue de del 84% y 94% respectivamente. La identificación molecular de la bacteria en perros y garrapatas mostró una homología con *R. rickettsii* del 100% y 99% respectivamente con las secuencias reportadas en el GenBank.

La enfermedad de Lyme es una enfermedad emergente transmitida por garrapatas, esta espiroqueta puede causar daños multisistémicos en los humanos. En los 1980, fue identificada por primera vez el agente causal de la enfermedad *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Burgdorfer, 1984; Dunlop and Williams, 1996; Manley, 1996) esta enfermedad es considerada una de las más importantes infecciones transmitidas por garrapatas a humanos en Europa y los Estados Unidos de Norte América (Schmid GP, 1985). Diferentes estudios sugieren que la infección de *Borrelia burgdorferi* es endémica en México. Se obtuvo evidencia molecular de *B. burgdorferi* al amplificar secuencias de DNA correspondientes a la espiroqueta procedente de líquido sinovial de perros con artritis de la zona urbana de Monterrey (Salinas 1999). También un estudio realizado en la ciudad de Mexicali, se obtuvo una seroprevalencia del 6.8% en perros infestados por *R. sanguineus* es importante resaltar que no se ha registrado la presencia de otro vector en esa área (Tinoco et al., 2008). En base a lo anterior se realizó un estudio en el que se incluyeron 384 muestras de humanos, 32 de perros con signología clínica sugerente a Borreliosis y 11 garrapatas procedentes de la Cd. de Ensenada, se realizó PCR a la totalidad de las muestras, para esto se utilizaron oligos específicos para *Borrelia burgdorferi* FLA y BB. Los resultados de PCR de humanos fueron negativos en su totalidad, en cuanto a perros 21% (7/32) resultaron positivos a la técnica de PCR utilizando los iniciadores FLA para *Borrelia burgdorferi* sensu lato y el 31% (10/32) resulto positivo a la técnica cuando se utilizaron los iniciadores BB específicos para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, el 36%(4/11) de las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* resultaron positivas a la técnica de PCR utilizando los iniciadores FLA y el 54% (6/11) utilizando los iniciadores BB.

## ABSTRACT

A great amount of bacteria and parasites transmitted by ticks are considered as pathogens of high importance, becoming a relevant problem for the public health since the majority of them can get humans infected. In Mexico, there is limited information in regards to the prevalence of the diseases transmitted by ticks and pathogens zoonoticos in humans, dogs and ticks. In the northern states of the country; Baja California and Sonora, prevalences of the *Rhipicephalus sanguineus* have been documented. *Rhipicephalus sanguineus* is a vector of various diseases the most common are: *Ehrlichia canis*, *Coxiella burnetti*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia rickettsii*. The Rocky Mountain spotted fever (FMMR) is caused by *Rickettsia rickettsii*, obligated intracellular, zoonotic disease of high importance because of its mortality (on patients that did not receive antibiotics on time up to 30%), because of its unspecified clinical signs and because can affect different systems.

Only limited information is currently available on the prevalence of vector borne and zoonotic pathogens in dogs and ticks in México. The aim of this study was to use different techniques to detect and characterize *Rickettsia rickettsii* and *Borrelia burgdorferi* in humans, dogs and ticks. 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 3.1% (95% IC, 0.8-5.3). The sensitivity and specificity of the modified test for human use was 84% and 94% respectively. Molecular identification of the bacteria and ticks in dogs showed a 100% and 99% homology with *R. rickettsia*, respectively with the sequences reported in GenBank.

Lyme disease is an emerging tick-borne spirochetal infection that can cause multisystem human illness. In the 1980s, the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, was first identified within the guts of vector ticks (Burgdorfer, 1984; Dunlop and Williams, 1996; Manley, 1996) and the disease is

currently considered the most important vector-borne human infection in Europe and the United States (Schmid GP, 1985).

Studies have suggested that *Borrelia burgdorferi* infection might be endemic to Mexico (Gordillo et al., 1999; Gordillo et al., 2003 Tinoco et al., 2008). Molecular evidence of *B. burgdorferi* was also found by amplification and DNA selected sequences from synovial fluid samples from dogs with arthritis, which suggests the presence of Lyme disease in the Monterey area (Salinas 1999). In a study in the city of Mexicali, Mexico, seroprevalence to this spirochete was determined using the semiquantitative kit *B. burgdorferi* ELISA, which resulted in 6.8%, with this results they confirm the existence of *B. burgdorferi* in dogs in an area where *Rhipicephalus sanguineus* is the only tick that has been indentified so far (Tinoco et al., 2008). Based on the previous information, a study was conducted which included 384 human samples, 32 dogs samples with clinical markers suggesting borreliosis and ticks from Ensenada, Baja California. PCR was performed on all the samples utilizing primers specifically to indentify borrelias burgdorferi *FLA Y BB*.

The results for the human samples were negative, for dogs 21% of dogs tested positive for *FLA* and 31% for *BB*. The ticks tested positive for *FLA* 36% of the sample and 54% for *BB*.

**Keywords:** Tick-borne, zoonoses, public healt.

## INTRODUCCIÓN

Una gran cantidad de bacterias y parásitos transmitidos por garrapatas son considerados como patógenos de gran importancia, volviéndose un problema relevante para la salud pública ya que la mayoría de estos pueden infectar a humanos. Al ser hematófagos las garrapatas son capaces de transmitir agentes infecciosos como bacterias, virus y protozoarios (Shaw et al., 2001). Hasta 1996 fueron mundialmente reconocidas 896 especies o subespecies de garrapatas (Cámicas et al., 2006). En México se han reconocido 24 especies que parasitan: anfibios (2 especies), reptiles (6 especies), pájaros (2 especies) y mamíferos (14 especies), distribuidas mayormente en la región tropical (Guzmán et al., 2006).

En los estados del norte del país; Baja California y Sonora, se han documentado prevalencias de la garrapata café del perro, *Rhipicephalus Sanguineus* (Tinco et al., 2009, Álvarez y Contreras 2013), al igual que en los estados colindantes Arizona (Demma et al., 2005) y California (Fritz et al., 2009).

Entre las principales enfermedades zoonóticas transmitidas por garrapatas se encuentran: la enfermedad de Lyme, erliquiosis, babesiosis, fiebre de las montañas rocosas, fiebre de la garrapata de Colorado, tularemia, fiebre Q, parálisis por garrapatas, fiebre botonosa y encefalitis por garrapata (Spach et al., 1993).

*Rhipicephalus sanguineus* es vector de varias enfermedades entre las que se destacan: *Ehrlichia canis*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, y *Rickettsia rickettsii*.

En los últimos años diversas bacterias transmitidas por vectores han sido identificadas en humanos, animales y vectores de los estados del norte del país; en Baja California se han identificado diversas bacterias rickettsiales y espiroquetas transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*; *Ehrlichia* (*E. canis*) en perros (Haro et al., 2007), *Borrelia burgdorferi* en perros y garrapatas (Tinoco et al., 2009), *Rickettsia rickettsii* en humanos, perros y garrapatas (Field et al., 2015). En el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) desde el año 2004 se han registrado 121 casos de FMRR y 35 de esos niños han fallecido (Álvarez y Contreras 2013).

Los perros son susceptibles a varias de estas enfermedades y están expuestos frecuentemente a las garrapatas. Por ello es recomendado hacer muestreos de animales y vectores para la identificación de patógenos, por estos motivos son buenos indicadores para evaluar el riesgo a humanos en zonas endémicas (Roux and Raoult 1999).

Diferentes métodos de diagnóstico han sido utilizados para evaluar la existencia de enfermedades transmitidas por garrapatas; Los métodos moleculares como PCR tiempo real y punto final. 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 inmunoflorescencia. Los métodos serológicos tienen la desventaja de tener reacciones cruzadas, pero son frecuentemente utilizados para estudios de seroprevalencia.

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.

## ARTÍCULO 1.

### **Rickettsiosis: seroprevalencia en humanos e identificación molecular de *Rickettsia rickettsii* en perros y garrapatas de Ensenada, Baja California, México.**

L Tinoco-Gracia<sup>a</sup>, A Escárcega-Avila<sup>a</sup>, A Barreras-Serrano<sup>a\*</sup>, J Field-Castro<sup>b</sup>, G López-Valencia<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, México.

<sup>b</sup>Escuela Ciencias de la Salud, Ensenada, Universidad Autónoma de Baja California, México.

\* Fracc. Laguna Campestre Carr. A San Felipe Km 3.5. Mexicali, Baja California, México; abarreras@uabc.edu.mx

#### **SUMMARY**

An observational, descriptive, cross-sectional study was carried out to estimate rickettsiosis seroprevalence in humans from Ensenada, Baja California, in the northwest of Mexico. 384 blood samples were included in the study. Antibodies against *Rickettsia rickettsii* were measured with a commercial kit suitable for use in dogs using a human anti-human IgG conjugate. Furthermore, a molecular identification of *R. rickettsii* in dogs and ticks, using specific primers were realized. Also, risk factors and clinical manifestations were evaluated in association with seropositivity. In the hypothesis concerning a difference between two proportions for gender, age and occupation groups a Chi-squared test was used, and Odds Ratio (OR) as association measure at 95% CI. The human rickettsiosis seroprevalence was 3.1 %. The sensitivity and specificity of the modified test for human use was 84% and 94% respectively. Molecular identification of the bacteria and ticks in dogs showed a 100% and 99% homology with *R. rickettsia*, respectively with the sequences reported in GenBank. No significant differences associated with gender, age, occupation, household dogs, pet deworming program against ticks, type of yard and dogs mobility between home and the street were observed. Clinical signs associated ( $P < 0.05$ ) with rickettsiosis were: epistaxis, vomiting, arthralgia, and myalgia.

key words: *Rickettsia rickettsii* , humans, epidemiology, seroprevalence .

## RESUMEN

Un estudio observacional, descriptivo, seccional cruzado, se llevó a cabo para estimar seroprevalencia en humanos a rickettsiosis en Ensenada, Baja California, al noroeste de México e incluyó 384 muestras de sangre. Los anticuerpos contra Rickettsias del grupo de las fiebres manchadas fueron medidos con un kit comercial de uso en perros con (antígeno de *Rickettsia rickettsii*) adaptado para humanos utilizando un conjugado anti-IgG humana. Además, se realizó una identificación molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas utilizando iniciadores específicos. También, se evaluaron factores de riesgo y manifestaciones clínicas en su asociación a la seropositividad. En la prueba de igualdad de proporciones de seropositividad entre los grupos de género, edad y ocupación se utilizó Chi-cuadrada y como medida de asociación, la razón del producto cruzado (OR) junto con IC95%. La seroprevalencia a rickettsiosis en humanos fue del 3,1%. La sensibilidad y especificidad de la prueba modificada para su uso en humanos fue de del 84% y 94% respectivamente. La identificación molecular de la bacteria en perros y garrapatas mostró una homología con *R. rickettsii* del 100% y 99% respectivamente con las secuencias reportadas en el GenBank. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas asociadas al 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. Los signos clínicos asociados ( $P < 0,05$ ) a rickettsiosis fueron: epistaxis, vómito, artralgias y mialgias.

**Palabras clave:** *Rickettsia rickettsii*, humanos, epidemiología, seroprevalencia.

## INTRODUCCIÓN

La fiebre manchada de las montañas rocosas (FMRR) es causada por *Rickettsia rickettsii*, bacteria intracelular obligada transmitida por garrapatas. Esta enfermedad zoonótica es importante por su alta mortalidad (hasta el 30% en pacientes no tratados a tiempo con antibióticos), por su signología inespecífica, por ser polisistémica y por su curso corto (12 días) Walker (1995).

En México a pesar de la existencia de áreas, que reúnen condiciones geográficas, epidemiológicas, demográficas y socioeconómicas, que favorecen la presencia de vectores transmisores de rickettsias, poca información se ha generado sobre el tema (Bustamante and Pon 2011).

En México *R. sanguineus* es reconocido como el principal vector transmisor de *R. rickettsii*, en algunas partes de África, Asia y Europa, es considerado como vector de *R. conorii* (Burgdorfer et al., 1975).

Tinoco et al (2009) en un estudio con perros, llevado a cabo en la Ciudad de Mexicali, Baja California, México, encontraron que el 59,6% (56/94) resultó parasitado por garrapatas, de las cuales el 100% fueron identificadas por su morfología como *R. sanguineus*, uno de los vectores potenciales de *R. rickettsii* siendo este el único vector identificado en Mexicali Baja California y sus alrededores. Anteriormente Romano et al (1998) reportaron el 16,6% (5/30) de seroprevalencia para rickettsiosis en perros en Mexicali. En el 2011 a causa de un brote de rickettsiosis en humanos la Secretaría de Salud a través del sistema nacional de vigilancia epidemiológica reportaron 734 casos probables y 278 confirmados por serología (Bustamante and Pon 2011).

En 2011 se identificaron molecularmente la bacteria *R. rickettsii* en la zona fronteriza de Mexicali Baja California, y resultó diferente genéticamente a las encontradas en norte, centro y sur América. Además caracterizaron molecularmente a la garrapata *R. sanguineus* presente en Mexicali BC, con diferencias genéticas respecto a la *R. sanguineus* estadounidense (Eremeeva et al., 2011).

Dentro de los métodos de diagnóstico eficaces para esta enfermedad se encuentran: el cultivo de la bacteria, el PCR, el Western blot, la IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) y la ELISA (Tzianabos et al., 1989; Roux et al., 1996; Kováčová et al., 2000; Labruna et al., 2004; Anaya et al., 2008).

El método IFA se considera 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 o IgM, aunque tiene la desventaja de generar reacciones cruzadas entre rickettsias del mismo grupo, por lo que el título final solo da un indicio de la identidad de la bacteria (Newhouse et al., 1979). La prueba ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es sencilla de realizar y capaz de detectar anticuerpos contra *R. rickettsii*. Aunque poco utilizada, en los años 70 Dash y Weiss realizaron un estudio en el que contrastaron ELISA e IFA concluyendo que ELISA era igual de sensible que IFA y además con la ventaja de no ser una prueba subjetiva como IFA ya que no se requiere de un microscopio fluorescente para el diagnóstico. Keysary and Srenger (1997) desarrollaron una ELISA utilizando como antígeno lipopolisacáridos rickettsiales, como medio para diferenciar serológicamente algunas rickettsias del grupo FMMR y Tifus Murino (TM) en pacientes que tuvieron reacciones cruzadas a IFI.

La mayor complejidad para la aplicación de ELISA radica en la producción del antígeno. Lo anterior debido a que los métodos descritos exigen la separación total de las rickettsias de la célula huésped utilizando gradientes de densidad como renografía los cuales son muy costosos (Dash y Weiss 1977). Sin embargo existen en el mercado kits de ELISA eficaces para el diagnóstico de rickettsiosis para humanos y caninos.

Factores de riesgo con asociación a rickettsiosis, incluyen la edad, el género, la convivencia con perros infestados con el vector *R. sanguineus* y las altas temperaturas en verano (Demma y col 2006), aunque existen otros más que necesitan evaluarse en su asociación con la enfermedad. 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., 2001; Raoult and Parola 2007).

En base a lo anterior se plantearon los siguientes objetivos: 1) Estimar la seroprevalencia para rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos de Ensenada Baja California, México, utilizando kits de ELISA para caninos modificados para su uso en humanos, 2) Detectar e Identificar molecularmente las bacterias del género rickettsial presentes en perros y garrapatas de la misma ciudad, 3) Evaluar factores de riesgo y manifestaciones clínicas asociados a la seropositividad.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Diseño del estudio***

El diseño del estudio fue observacional descriptivo transversal, el cual incluyó muestras de sangre de humanos residentes de la zona urbana de Ensenada, Baja California, México, las muestras fueron recolectadas por estudiantes de la Escuela Ciencias de la Salud, Ensenada, Universidad Autónoma de Baja California, en un periodo de 8 meses iniciando el proyecto el 25 de Octubre del 2009 y culminando con la recolección de muestras el 15 de Octubre del 2010. Las muestras fueron enviadas para su procesamiento al Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California (LSPV-IICV-UABC).

### ***Consideraciones éticas y criterios de inclusión***

Este estudio cumplió con los lineamientos que en materia de investigación y ética, que 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 o edad; 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 para un muestreo simple aleatorio por atributos, considerando población infinita, confiabilidad del 95%, precisión del 5% y varianza máxima ( $p=0.5$ ), dando un total de 384 muestras (Cochran 1977).

### ***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 etileno diamino tetra acético (EDTA) 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 3.500 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  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar las pruebas serológicas.

### **Análisis serológico**

Las muestras fueron colectadas por estudiantes de la facultad de medicina de la UABC 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. La dilución de los sueros sanguíneos utilizada para la técnica de ELISA 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 diagnosticados como negativos por la prueba de IFA a una dilución de 1:32 y sin historia de signos clínicos compatibles con rickettsiosis y de mordeduras de garrapata más 2 desviaciones estándar (Halle and 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 (Instituto de Servicios de Salud Pública de Baja California) declarado positivo por el InDRE (Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos).

Para determinar la sensibilidad y la especificidad en humanos se sometieron 32 muestras a IFA por ser ésta la prueba de oro en cuanto a diagnóstico serológico se refiere. 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), iniciando la dilución seriada de 1:64 hasta 1:1024 Se utilizó el FITC conjugado anti-IgG humana (SIGMA) a una dilución de 1:1.000. Se utilizaron los mismos controles positivos y negativos empleados para la prueba de ELISA.

### **Identificación molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas**

*Naturaleza de los sujetos de estudio.* Durante el período de julio a 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 (Piranda et al., 2008). A estos se les tomó una muestra sanguínea de la región venocefálica de 3 ml y se colocaron 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 and Restifo 2000). Los tubos de 12 ml con tapadera hermética, colectores de garrapatas, fueron enviados al LSPV-IICV-UABC, donde se conservaron en congelación a -80°C hasta el momento de la identificación taxonómica, la cual se realizó bajo observación estereoscópica (Quiroz 1999).

Las muestras sanguíneas se enviaron y procesaron en el LSPV-IICV-UABC. El procesamiento de la muestra se llevó a cabo de la siguiente manera: 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 se utilizó el kit comercial Qiagen, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

Las garrapatas fueron procesadas al momento de recibirlas en el laboratorio, se utilizaron una o dos garrapatas por muestra de cada perro estas fueron diseccionadas con bisturí de punta fina para obtener intestino, glándula salival y hemolinfa, después se colocaron en 180  $\mu$  L del buffer ATL (contenido en el Kit de extracción Qiagen) agregando 100  $\mu$  g/mL de proteinasa K, para después ser colocadas a 56°C por 6 horas. Los siguientes pasos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN en tejidos. Se corroboró la existencia de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Se utilizó como blanco un fragmento del gen codificante de la citrato sintasa *gltA* (Labruna et al., 2004). 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 SYBR® Safe DNA Gel Stain. 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 editó en el programa Bio Editor después se sometió al programa Blast para obtener los porcentajes de homología e identidad con las secuencias de rickettsias reportadas en el GenBank.

### ***Evaluación de factores de riesgo y manifestaciones clínicas***

Se aplicó un cuestionario epidemiológico con 23 preguntas a los sujetos en el momento de la toma de muestra sanguínea, el cuestionario contenía las secciones: a) datos personales (edad, sexo, ocupación), b) signología clínica y el haber sido mordido por garrapata, todas ellas de naturaleza dicotómica y c) Información respecto a las mascotas en casa y la implementación de medidas preventivas para el control de garrapatas.

### **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) captura de respuesta al cuestionario epidemiológico y signos clínicos. La seroprevalencia se generó al dividir el número de pacientes positivos a ELISA entre el total de pacientes muestreados. Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA modificada para su uso en humanos, fueron calculados de acuerdo a una tabla de contingencia 2x2 (Gordis 2005). La concordancia entre las pruebas de ELISA e IFA se evaluó implementando el estadístico kappa, analizándola con el procedimiento FREQ del paquete SAS 9,2 (SAS 1990).

Los valores de seroprevalencia entre los grupos de sexo, edad y ocupación del paciente fueron evaluados con el estadístico chi-cuadrada para la hipótesis nula de igualdad de proporciones entre grupos empleando un nivel de significancia del 5% (Devore and Peck 2001). La asociación entre los resultados positivos a la signología y el haber sido mordido por garrapata con el diagnóstico de

seroprevalencia se evaluó con OR (razón de desigualdad) mediante el análisis en tablas de contingencia 2x2. Además se calcularon intervalos de confianza al 95% para cada OR. La valoración estadística de las asociaciones se realizó con los intervalos de confianza, de tal manera que valores de OR > 1 con valores > 1 en los límites inferiores y superiores del intervalo de confianza indicó significancia, siendo no importante ( $P > 0,05$ ) cuando no cumple con esta restricción. La información disponible sobre mascotas en casa y la aplicación de medidas preventivas para el control de garrapatas (número de perros en el hogar, baños garrapaticidas, desparasitar mascotas, movilidad del perro en la casa, patio y calle, tipo de patio), fue re-categorizada como variable dicotómica y analizada su asociación con los resultados seropositivos a rickettsiosis empleando OR en tablas 2x2, incluyéndose intervalos de confianza al 95% para cada OR. El análisis se realizó aplicando el procedimiento FREQ del paquete SAS.

## RESULTADOS

El valor de seroprevalencia de rickettsiosis en pacientes fue de 3,1% (12/384). Los valores de sensibilidad y especificidad generados del kit comercial fueron del 84% y 94% respectivamente el valor verdadero positivo fue de 92% y el valor verdadero negativo fue de 90%

La concordancia entre los valores generados por ELISA e IFA, evaluada por el estadístico kappa, fue de 0,80 cuya interpretación por su magnitud es alto según Landis and Koch (1977).

### **Identificación molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas**

De un total de 40 muestras de ADN extraído de sangre de perros sometidas a PCR, sólo una resultó positiva al gen *gltA* correspondiente a 401 pares de bases, la secuencia del producto del PCR de dicha muestra mostró una homología del 100% con las secuencias de *R. rickettsii* de las cepas L12395, L104, L102 (JN375499.1, JN400378.1, JN400377.1) disponibles en el GenBank. Además, sólo una de las muestras de ADN de garrapata identificada morfológicamente como *R. sanguineus*, de Ensenada B.C., México, resultó positiva a *R. rickettsii*, la secuencia del producto de PCR de dicha muestra arrojó una homología del 100% con las secuencias de *R. rickettsii* de las cepas L12395, L104, L102 (JN375499.1, JN400378.1, JN400377.1) disponibles en el GenBank.

### **Evaluación de factores de riesgo y manifestaciones clínicas**

La seroprevalencia de rickettsiosis mostró una proporción similar ( $P > 0,05$ ) entre las clases de sexo, grupos de edad, y grupos de ocupación. Además, no existió asociación ( $P > 0,05$ ) entre los factores de riesgo considerados con los seropositivos. De igual manera no se observó asociación ( $P > 0,05$ ) entre las variables re-categorizadas a dicotómicas (mascotas en casa, número de perros en el hogar, aplicación de baños garrapaticidas, desparasitar mascotas, movilidad del perro en la casa, patio y calle, tipo de patio).

Respecto a la manifestación de signos clínicos, aquellos con asociación ( $P < 0,05$ ) al grupo seropositivos se presentan en el Cuadro 1. La epistaxis resultó un factor asociado a los casos positivos a rickettsiosis ( $P < 0,05$ ), con 4,62 veces más probabilidades de resultar positivo a rickettsiosis al presentar sangrados nasales. También, el presentar vómito resultó 3,52 veces más probabilidad de ser seropositivo. Aquellos pacientes que presentaron artralgias o mialgias resultaron con 4,38 y 3,59 veces más probabilidad de observar un resultado positivo en el análisis serológico, respectivamente. Sin embargo, pacientes que manifestaron haber sido mordido por garrapatas, presentar claudicación y el observar en ellos problemas neurológicos, no resultaron con asociación ( $P > 0,05$ ) a casos positivos a rickettsiosis.

## 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 (Sato et al., 2001; Elchos and Goddard 2003; Labruna et al., 2004; Zavala et al., 1996). La seroprevalencia de rickettsiosis (*R. rickettsii*) en humanos obtenida en este trabajo fue del 3,1%, mayor al resultado de En Yucatán con 0,5% (2/390) quienes utilizaron IFA como técnica diagnóstica, participando los vectores: *A. cajennense* y *R. sanguineus*, (Zavala et al., 1999). Sin embargo resultó similar a la obtenida por Pinter y colaboradores en el 2008 en una zona de Brasil, con un valor de seroprevalencia del 2,8% en humanos, diagnosticada por IFA y donde el vector fue *A. aureolatum*. Graf et al., (2008) reportaron un valor de seroprevalencia del 6% en un total de 10.000 sujetos de diversas localizaciones en los Estados Unidos, sin importar la presencia de signos clínicos de la enfermedad, empleando ELISA. Los vectores que participan en la transmisión de la *R. rickettsii* en Estados Unidos son *Demacentor variabilis* y *Demacentor andersonii*. El mayor valor de seroprevalencia reportada en humanos,

fue la obtenida por Hidalgo et al., (2007) en Colombia, la cual fue del 40,3% empleando IFA, explicado por reacciones cruzadas con otras rickettsias. En este estudio participaron los vectores: *A. cajennense*, *R. sanguineus*, y *Dermacentor nitens*, aumentando las probabilidades de transmisión al humano.

IFA es considerada como la prueba de oro para el diagnóstico serológico de las enfermedades rickettsiales en humanos y animales, (Pinter et al., 2008), sin embargo tiene la desventaja de ser una prueba subjetiva ya que el diagnóstico se realiza por medio de microscopia fluorescente además de observarse reacciones cruzadas en algunos casos. ELISA ha sido una herramienta utilizada como método diagnóstico desde 1970 (Clements et al., 1983), sobretodo en casos de reacciones cruzadas de IFA.

La capa externa de la bacteria (*R. rickettsii*) contiene algunos lipopolisacáridos específicos (Jones et al., 1993) que se han utilizado como antígeno para las placas de ELISA, esto ha aumentado la especificidad de ELISA, la eficiencia en el diagnóstico y con ello su valor económico. La alta especificidad (94%) del kit comercial de *R. rickettsii* ELISA<sup>®</sup> Helica Biosystems, Inc., modificado para su uso en humanos pueden explicarse por la calidad del antígeno fijado en las placas del kit, mientras que la sensibilidad moderada (84%) por el alto valor del punto de corte. En la literatura existen varios trabajos comparando ELISA e IFA, entre ellos, Clements et al., (1983) obtuvieron 100% de sensibilidad y 100% de especificidad por ELISA, mientras que con IFA solo un 83% de sensibilidad y un 100% de especificidad, utilizando antígenos extraídos de cultivos de *R. rickettsii* en embrión de pollo.

En cuanto a la identificación molecular de la bacteria en perros, solo una de las muestras resulto positiva a la técnica de PCR, por la dificultad de la localización de la bacteria en el torrente sanguíneo, ya que solo 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* de varias cepas reportados en el GenBank. 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 previamente descrita (Quiroz 1999), el cual es considerado como el vector principal de *R. rickettsii* en México.

Los signos clínicos observados con frecuencia en pacientes que cursan o que han cursado por rickettsiosis incluyen al menos alguno de los siguientes: fiebre alta, dolor de cabeza y dolor muscular, a menudo pueden ser acompañados por náusea, vómito, exantema, dolor abdominal, desórdenes respiratorios y coagulopatías o ninguno de ellos. Lo que lleva a catalogarse como una enfermedad heterogenea en sus presentaciones e incluso confundirse con infecciones virales (Elston 2005). La mayoría de los pacientes al inicio no presenta la clásica triada que corresponde a fiebre, exantema e historia de mordedura de garrapata (CDC 2003). Existen estudios donde se observa variabilidad en la signología clínica en pacientes durante el curso de la enfermedad (Zavala et al., 2008; De Lara Huerta and Cárdenas Barragán 2008; Bustamante et al., 2011).

En el presente trabajo sólo el 25% (3/12) de los seropositivos declararon haber presentado fiebre meses antes o durante el muestreo, el 50% declaró haber padecido de mialgias, artralgias y vómito, mientras que solo el 66% manifestó la presencia de cefalea. 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. En este estudio los signos clínicos que resultaron asociados a la seropositividad fueron vómito, epistaxis, artralgia y mialgias, sin embargo estos no son específicos de esta enfermedad ya que pueden observarse en diversas patologías. Aunque se ha registrado que las mialgias y artralgias perduran por meses hasta años en algunos pacientes que han padecido de rickettsiosis (Walker et al., 2003).

**Cuadro 1. Análisis de los factores asociados<sup>1/</sup> a los casos positivos a rickettsiosis causada por *R. rickettsii* en pacientes de Ensenada, B.C.**

<b>Signo clínico</b>	<b>OR</b>	<b>IC al 95%</b>
<b>Epistaxis</b>	<b>4,62</b>	<b>1,17 – 18,17</b>
<b>Vómito</b>	<b>3,52</b>	<b>1,10 – 11,21</b>
<b>Artralgias</b>	<b>4,38</b>	<b>1,26 – 15,23</b>
<b>Mialgias</b>	<b>3,59</b>	<b>1,12 – 11,43</b>

<sup>1/</sup> (P < 0,05)

## LITERATURA CITADA

- Anaya E, C Morón, P Arias, J Chauca, R Román. 2008. Evaluación de pruebas de elisa e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra rickettsiosis. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 25, 336-339.
- Burgdorferi W, D Sexton, R Gerloff, R Anacker, R Philip, L Thomas.1975. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a New Spotted Fever Group Rickettsia in the United States 12, 1.
- Bustamante M J, M A Pon. 2011. Boletín 130. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 27
- Centers for Disease Control y Prevention (CDC). 2003. Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in family clusters-three states. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 21, 407-410.
- 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.
- Clements M L, J S Dumler, P Fiset, C L Wisseman, M J Snyder, M M Levine. 1983. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: Comparison of IgM y IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays y Indirect Fluorescent Antibody Test. *Journal of Infectious Disease* 148, 876-880.
- Cochran, G William. Técnicas de Muestreo. 1977. México D.F. CECOSA.
- Dash E, E Weiss. 1977. Characterization of the Madrid E strain of *Rickettsia prowazekii* purified by renografin density gradient centrifugation. *Infect Immun* 15, 280-286.
- 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. *Rev de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* Vol. XXII Núm. 85.
- Demma L J, 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, 423-429.

- Devore J, R Peck. 2001. *Statistics, The Exploration y Analysis of Data*, Ed. 4, Duxbury Press.
- Elchos BN, J Goddard. 2003. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs y their owner. *J Am Vet Med Assoc* 223, 1450-1452.
- Elston DM. 2005. Rickettsial skin disease: uncommon presentations. *Clin Dermatol* 23, 541-544.
- Eremeeva E M, Zambrano M L, Anaya L, Beati L, Karpathy S E, Santos-Silva MM, Salceda B, Macbeth D, Olguin H, Dasch G A and Alpuche A C. 2011. *Rickettsia rickettsii* in Rhipicephalus Ticks, Mexicali, Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 48 (2): 418-421.
- Farley D. 1996. Fighting Fleas y Ticks. Preventing Tick-Borne Disease. FDA consumer magazine.
- Gordis Leon. 2005. Evaluación de la validez y fiabilidad de las pruebas diagnósticas y de cribado. En: *Epidemiología* 3ra. Edición. ELSEVIER, Barcelona, España Pp 71-94.
- Graf Paul C F, J P Chretien, L Ung, C Gaydos, Allen, L Richards. 2008. Prevalence of Seropositivity to Spotted Fever Group Rickettsiae y *Anaplasma phagocytophilum* in a Large, Demographically Diverse US Sample. *Clinical Infectious Diseases* 46, 70–77.
- Halle S, 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. *J Clin Microbiol* 12, 343-350.
- Hidalgo M, R Sánchez, L Orejuela, J Hernández, D H Walker, 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, 378-380.
- Jones D, B Yerson, J Olson, C Greene. 1993. Enzyme - Linked immunosorbent Assay for Detection of Human Immunoglobulin G to Lipopolysaccharide of Spotted Fever Group Rickettsiae. *J Clin Microbiol* 31, 138-141.

- Keysary A, C Strenger. 1997. Use of enzyme-linked immunosorbent assay techniques with cross-reacting human sera in diagnosis of murine typhus and spotted fever. *J Clin Microbiol* 35, 1034-1035.
- Kováčová E, 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.
- Landis J, G Koch. 1977. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 33, 363-374.
- Lyon W F, R A Restifo. 2000. Tick removal. Ohio State University Extension Fact Sheet Entomology, *HYG* 2073-2098.
- Eremeeva M E, M L Zambrano, L Anaya, L Beati, S E Karpathy, M M Santos-Silva, B Salceda, D Macbeth, H Olguin, A Dasch, C Alpuche Aranda. 2011. *Rickettsia rickettsii* in Rhipicephalus Ticks, Mexicali, Mexico. *Journal of Medical Entomology* 48, 418-421.
- Newhouse V F, C C shepard, M D Redus, T Tzianabos, J E Mcdade. 1979. A Comparison of the Complement Fixation, Indirect Fluorescent Antibody, and Microagglutination Tests for the Serological Diagnosis of Rickettsial Diseases. *Am J Trop Med Hyg* 28, 387-395.
- Parola P, D Raoult. 2001. Ticks y Tickborn Bacterial Diseases in Humans: An Emerging infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases* 32, 897-928.
- 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, 247-252.

- Piranda E M, J L Faccini, A Pinter, T B Saito, R C Pacheco, M K Hagiwara, M B Labruna. 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: *clinical and laboratory findings*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 103, 696-700.
- 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.
- 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.
- Roux V, F Pierre-Edouard, D Raoult. 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.
- Satoh H, A. Tsuneki. 2001. Seroprevalence of antibodies against spotted fever group *rickettsia* among dogs and humans in Okinawa. *Japan Microbiol Immunol* 45, 85-87.
- Tinoco-Gracia L, H Quiroz, M M 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.
- Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. 2003. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann NY Acad Sci* 990, 1-11.
- Walker, DH. 1995. Rocky Mountain spotted fever: a seasonal alert. *Clin Infect Dis* 20, 1111-1117.

- Zavala-Castro J E, K R Dzul-Rosado, J A Leon, D H Walker, J E Zavala-Velazquez. 2008. An Increase in Human Cases of Spotted Fever Rickettsiosis in Yucatan, Mexico, Involving Children. *Am J Trop Med Hyg* 79, 907-910.
- Zavala-Velazquez J E, Yu Xue-Jie, D H Walker. 1996. Unrecognized Spotted Fever Group Rickettsiosis Masquerading as Dengue Fever in México. *Am J Trop Med Hyg* 55, 157-159.
- Zavala-Velazquez J E, J Ruiz-Sosa, I Vado-Solis, A N Billings, D H Walker. 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.

## ARTÍCULO 2.

### **Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos de Ensenada, Baja California, México**

Field-Cortázares, Jorge; Escárcega-Ávila, Angélica María; López-Valencia, Gilberto;  
Barreras-Serrano, Alberto; Tinoco-Gracia, Luis  
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias,  
Universidad Autónoma de Baja California, México

#### **Resumen**

La rickettsiosis causada por *Rickettsia rickettsii* (bacteria intracelular obligada) es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* en México, es capaz de infectar a vertebrados, incluyendo a humanos. Los síntomas son; fiebre alta, cefalea, mialgia, náusea, vómito, dolor abdominal y tos. La mortalidad puede ser hasta 30% en pacientes no tratados. El presente estudio descriptivo seccional cruzado, incluyó 384 muestras de humanos de Ensenada, Baja California. 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 molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas se utilizaron iniciadores específicos. La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis por *R. rickettsii* en humanos fue de 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. Con el resultado de acuerdo sustancial de kappa entre ELISA e IFA, se deduce que los resultados de seroprevalencia de este trabajo son confiables.

**Palabras clave:** Riquetsiosis, *Rickettsia rickettsii*, zoonosis, garrapatas, salud pública.

#### **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.

**Keywords:** Rickettsiosis, *Rickettsia rickettsii*, zoonoses, tick, public health.

## INTRODUCCIÓN

Las riquetsiosis son enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia*. Estas enfermedades constituyen un problema grave de salud pública a nivel mundial, ante la posibilidad de afectar amplios sectores de la población, la dificultad en el diagnóstico y los desenlaces fatales cuando no existe una intervención temprana en el tratamiento. Existen 24 especies de riquetsias reconocidas, de éstas 16 causan enfermedades riquetsiales. 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, por lo tanto la distribución geográfica de estas enfermedades dependerá de la distribución geográfica de sus vectores. Las riquetsias se divide en dos grupos: el grupo de las fiebres manchadas y el grupo de las fiebres tíficas esto depende de varias características: En el grupo de las fiebres manchadas se asocian como vectores a las garrapatas principalmente (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia conorii*) las que transmiten la enfermedad de manera transovárica (a toda su progenie) y transestadialmente (en cualquier estadio), pero también a pulgas (*Rickettsia felis*) y a los ácaros (*Rickettsia akari*). El grupo de las fiebres tíficas está asociado con piojos (*R. prowasekii*) o pulgas (*R. typhi*), que tienen a los mamíferos como reservorio. Es difícil determinar cuál de estas bacterias es de mayor patogenicidad para el humano, sin embargo *Rickettsia rickettsii* es la que causa más muertes al año <sup>1</sup>. La fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR) es causada por *Rickettsia rickettsii*, bacteria intracelular obligada. Estas especies se asocian a

artrópodos asociados a bacterias y son capaces de infectar a vertebrados, incluyendo los humanos, generalmente como huéspedes accidentales. Son organismos cortos, de forma cocobacilar, gram negativos de 0.8-2.0  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro <sup>2</sup>. En los Estados Unidos de 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 *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma americanum*, así como en Centro y Sudamérica <sup>2</sup>. En un estudio realizado en la ciudad de Mexicali, Baja California se observó que la mayoría (59.6%) de los perros que fueron incluidos en el estudio se encontraban parasitados por garrapatas y el 100% de estas fueron identificadas como *R. sanguineus* <sup>3</sup>.

Esta rickettsia causa vasculitis, produciendo eritema o petequias. La vasculitis ocurrida en órganos, por ejemplo en el cerebro o pulmones pueden conllevar a complicaciones poniendo en peligro la vida del paciente <sup>4</sup>. La FMMR es una enfermedad aguda con un periodo de incubación de 3-10 días, que inicia después de una mordedura de garrapata o de una exposición accidental en el laboratorio por inhalación. 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 <sup>5</sup>. La mortalidad por esta enfermedad puede ser hasta el 30% en pacientes no tratados a tiempo con antibióticos <sup>6</sup>. El pronto diagnóstico de esta enfermedad rickettsial es importante para ofrecer oportunamente el tratamiento eficaz con antibióticos. El cultivo bacteriano se puede utilizar para el diagnóstico, ya que es muy sensible, pero puede requerir hasta 60 días para dar un resultado positivo, limitando su utilidad clínica. Desde finales de los 80's, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que sirve para detectar el ácido nucleico rickettsial, ha estado disponible como un método de diagnóstico rápido y confiable. Los oligonucleótidos que se han utilizado para el diagnóstico de FMMR son para la amplificación de un segmento de los genes: *17-kDa*, citrato sintasa (*gltA*) y *OmpA* de la rickettsia <sup>7-10</sup>. Tradicionalmente, el diagnóstico de esta enfermedad se basa en pruebas serológicas, de éstas, el análisis de microimmunofluorescencia indirecta (IFA) ha resultado ser el más sensible y específico, pero generalmente no arroja resultados positivos en casos agudos. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es útil para el

diagnóstico de rickettsiosis (*R. rickettsii*), esta técnica utilizada en estudios epidemiológicos se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción <sup>11-12</sup>.

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 en Ensenada, B. C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño del estudio.** El presente estudio descriptivo seccional cruzado, incluyó: muestras de humanos mayores de un año de edad que acudieron a uno de los 3 laboratorios clínicos de diagnóstico privados que participaron 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 cualquier 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.** La muestra se colectó aleatoriamente sin reemplazo. El valor de  $p$  está incluido dentro de  $1.96 [ p(1-p)/n ]^{1/2}$  para  $\pi$ , entonces, el tamaño de muestra ( $n$ ) se obtuvo de aplicar la fórmula:

$$n = \pi (1 - \pi) \left[ \frac{Z}{d} \right]^2$$

13

Donde:

$n$  = tamaño de muestra, resultando 384

$\pi$  = estimador de varianza máxima 50 %

$Z = 1.96$

$d = 5 \%$

**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 etileno diamino tetra acético (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 con una sensibilidad y especificidad de 99.5 y 96% en perros 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 IFA y ELISA. La interpretación del resultado de kappa se basó en criterios establecidos <sup>14</sup>.

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 (+) 2 desviaciones estándar <sup>15</sup> de acuerdo a lo anterior el valor del punto de corte calculado 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 <sup>16</sup>. 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 signos clínicos.** Para evaluar los factores de riesgo en este estudio, se aplicó un cuestionario a los sujetos en el momento de la toma de muestra sanguínea (Anexo 1).

**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 tablas con la siguiente información: 1) resultados de los análisis serológicos en humanos; y 2) resultados de los cuestionarios epidemiológicos.

El valor de seroprevalencia se generó

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

La prevalencia ajustada se generó de aplicar la ecuación descrita previamente <sup>17</sup>.

Hipótesis a probar:

1. Si el valor generado de seroprevalencia es igual o distinto de cero.
2. Si el valor generado de seroprevalencia es igual en hombres que en mujeres, así como entre grupos de edad y ocupación.
3. Existe asociación entre los factores de riesgo con los resultados seropositivos y seronegativos a riquetsiosis.
4. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad del kit de ELISA modificado a humanos, son adecuados para ser utilizada como prueba tamiz.
5. El nivel de concordancia entre las pruebas serológicas utilizadas en este estudio (IFA y ELISA) es bueno.

Las hipótesis 1 y 2 se evaluaron con el estadístico Z de análisis de proporciones (una proporción y comparación entre dos proporciones) La hipótesis 3 se probó con el estadístico ji cuadrada. Los valores de sensibilidad y especificidad para probar la hipótesis 4, fueron evaluadas 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)

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

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

La hipótesis 5 se evaluó con la prueba de concordancia kappa.

Se utilizaron los siguientes procedimientos del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) para Windows ver 6.12<sup>18</sup>:

1. Procedimiento FREQ, para someter a una prueba de hipótesis de distribución similar entre ellas, mediante el estadístico de prueba fue Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ).
2. Procedimiento FREQ, para el análisis de tablas de contingencia 2x2. Se obtuvieron valores de OR (razón de los grados de probabilidad para la población) univariados con un intervalo de confianza al 95%.
3. Procedimiento FREQ, para el análisis de tablas de contingencia 2x2. Se obtuvieron los valores de concordancia con la prueba de kappa.

**Análisis serológico.** Para la elaboración del diagnóstico serológico los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit comercial *Rickettsia rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., el cual detecta y semicuentifica IgG con una sensibilidad y especificidad de 99.5 y 96% en perros 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.

## RESULTADOS

***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.

***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 de acuerdo sustancial<sup>14</sup>.

## 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<sup>8,19-21</sup>. 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 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<sup>22</sup>; similar a la obtenida en una zona de Brasil, donde presentaron una seroprevalencia del 2.8% en humanos, el vector fue *A. aureolatum* y fue diagnosticada por IFA<sup>23</sup>. 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.

En Estados Unidos reportaron un valor de seroprevalencia del 6% en humanos empleando ELISA y muestreando un total de 10,000 sujetos de diversas localizaciones del país, sin importar la presencia de signos clínicos de la enfermedad<sup>24</sup>.

La seroprevalencia con mayor valor en humanos, reportada hasta el momento en Centro y Suramérica, fue obtenida 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 rickettsias<sup>25</sup>. 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 rickettsiales. 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. La mayoría de los pacientes no presenta la clásica triada que corresponde a fiebre, exantema e historia de mordedura de garrapata al inicio<sup>26</sup>. Existen estudios donde se describe

la signología clínica en pacientes durante el curso de la enfermedad por ejemplo, en pacientes hospitalizados a causa de rickettsiosis el 100% (9/9) presentaron fiebre y el 88% (8/9) declaró haber tenido vómito <sup>19</sup>, al igual que en el caso anterior el 100% (115/115) 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 <sup>27</sup>. Signología similar se presentó durante la fase de convalecencia en pacientes que murieron a causa de rickettsiosis 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 <sup>28</sup>. 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 rickettsiosis 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 <sup>23</sup>. ELISA ha sido una herramienta utilizada como método diagnóstico desde 1983 <sup>29</sup>, 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 lipopolisacáridos específicos<sup>30</sup> 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 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<sup>29</sup>. 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*<sup>12</sup>.

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<sup>12</sup>.

## 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.

## REFERENCIAS

- 1 Raoult, D. & Parola, P. Rickettsial diseases. 1 edn, (Informa healthcare, 2007).
- 2 La Scola, B. & Raoult, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2715-2727 (1997).
- 3 Tinoco-Gracia, L. et al. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet Rec.* 164, 59-61 (2009).
- 4 Silverman, D. J. *Rickettsia rickettsii*-induced cellular injury of human vascular endothelium in vitro. *Infect. Immun.* 44, 545-553 (1984).
- 5 Eremeeva, M. E., Dasch, G. A. & Silverman, D. J. Quantitative Analyses of Variations in the Injury of Endothelial Cells Elicited by 11 Isolates of *Rickettsia rickettsii*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 788-796, doi:10.1128/cdli.8.4.788-796.2001 (2001).
- 6 Walker, D. H. Rocky Mountain spotted fever: a seasonal alert. *Clin Infect Dis* 20, 1111-1117 (1995).
- 7 Kim, C. M. et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Applied and environmental microbiology* 72, 5766-5776 (2006).
- 8 Labruna, M. B. et al. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *J. Clin. Microbiol.* 42, 90-98, doi:10.1128/jcm.42.1.90-98.2004 (2004).
- 9 Stenos, J., Graves, S. R. & Unsworth, N. B. A Highly Sensitive and Specific Real-Time PCR Assay for the Detection of Spotted Fever and Typhus Group *Rickettsiae*. *Am J Trop Med Hyg* 73, 1083-1085 (2005).
- 10 Tzianabos, T., Anderson, B. E. & McDade, J. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2866-2868 (1989).

- 11 Kováčová, E. & Kazár, J. Rickettsial diseases and their serological diagnosis. Clin. Lab. 46, 239-245 (2000).
- 12 Anaya, E., Morón, C., Arias, P., Chauca, J. & Román, R. Serodiagnóstico de rickettsiosis por ELISA e Inmunofluorescencia IFI IgM. . Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Centro de Información y Documentación Científica. (2007).
- 13 Devore, J. & Peck, R. Statistics. The Exploration and Analysis of Data. 4th edn, (Duxbury-Thomson, 2001).
- 14 Landis, J. & Koch, G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. Biometrics 33, 363-374 (1977).
- 15 Halle, S. & Dasch, G. A. 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. J. Clin. Microbiol. 12, 343-350 (1980).
- 16 Labruna, M. B., Pacheco, R. C., Richtzenhain, L. J. & Szabo, M. P. J. Isolation of Rickettsia rhipicephali and Rickettsia bellii from Haemaphysalis juxtakochi Ticks in the State of Sao Paulo, Brazil. Appl. Envir. Microbiol. 73, 869-873, doi:10.1128/aem.02249-06 (2007).
- 17 Greiner, M. & Gardner, I. A. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. Prev Vet Med 45, 43-59 (2000).
- 18 SAS, I. I. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. (SAS Institute Inc, 2004).
- 19 Zavala-Castro, J. E., Dzul-Rosado, K. R., Leon, J. J. A., Walker, D. H. & Zavala-Velazquez, J. E. An Increase in Human Cases of Spotted Fever Rickettsiosis in Yucatan, Mexico, Involving Children. Am J Trop Med Hyg 79, 907-910 (2008).
- 20 Elchos, B. & Goddard, J. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. J Am Vet Med Assoc 223, 1450-1452, 1433 (2003).
- 21 Satoh, H. et al. Seroprevalence of antibodies against spotted fever group rickettsia among dogs and humans in Okinawa, Japan. Microbiol Immunol 45, 85-87 (2001).
- 22 Zavala-Velazquez, J. E., Ruiz-Sosa, J., Vado-Solis, I., Billings, A. N. & Walker, D. H. 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 (1999).
- 23 Pinter, A., Horta, M., Pacheco, R., Moraes-Filho, J. & Labruna, M. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of Sao Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica* 24, 247-252 (2008).
- 24 Graf, P. C. F., Chretien, J.-P., Ung, L., Gaydos, J. C. & Richards, A. L. Case Reports (II) [546-574] Prevalence of Seropositivity to Spotted Fever Group *Rickettsiae* and *Anaplasma phagocytophilum* in a Large, Demographically Diverse US Sample. *Rheumatology* 47, ii158-165, doi:10.1093/rheumatology/kem531  
10. 1086/524018 (2008).
- 25 Hidalgo, M. et al. Prevalence of Antibodies Against Spotted Fever Group *Rickettsiae* in a Rural Area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 77, 378-380 (2007).
- 26 CDC. Fatal Cases of Rocky Mountain Spotted Fever in Family Clusters-- Three States, 2003. *Arch Dermatol* 140, 1020-1021, doi:10.1001/archderm.140.8.1020 (2004).
- 27 De Lara Huerta, J. & Cárdenas Barragán, R. Fiebre manchada de las montañas rocosas en pediatría. Revisión clínica de una serie de 115 casos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría XXII* (2008).
- 28 Bustamante, M. J. & Pon, M. A. Actualización en la vigilancia epidemiológica de "rickettsiosis" (Segunda de Dos Partes). *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* 27 (2010).
- 29 Clements, M. L. et al. Serodiagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever: Comparison of IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Indirect Fluorescent Antibody Test. *The Journal of Infectious Disease* 148, 876-880, doi:10.1093/infdis/148.5.876 (1983).
- 30 Jones, D., Anderson, B., Olson, J. & Greene, C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin G to lipopolysaccharide of spotted fever group rickettsiae. *J. Clin. Microbiol.* 31, 138-141 (1993).



Gaceta Médica  
de México

**Editor**

Dr. Alberto Lifshitz

**Editores Asociados**

Dr. José Halabe Cherem  
Dr. Manuel Ramiro H.

## ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE MÉXICO, A.C.

CUERPO CONSULTIVO DEL GOBIERNO FEDERAL

**Presidente**

Dr. Enrique Ruelas Barajas

**Vicepresidente**

Dr. Enrique Graue Wiechers

**Secretario General**

Dr. Javier Mancilla Ramírez

**Tesorero**

Dr. Germán E. Fajardo Dolci

**Secretaria Adjunta**

Dra. Elsa Sarti Gutiérrez

México, D. F., a 28 de julio del 2014

**DR. JORGE FIELD CORTAZARES**

Presente

Estimado Dr. Field:

Por medio de la presente nos permitimos comunicarle que el artículo "Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos de Ensenada, Baja California, México" realizado por usted con la co-autoría de: Dra. Angélica María Escárcega Avila, Dr. Gilberto López Valencia, Dr. Alberto Barreras Serrano y Dr., Luis Tinoco Gracia; ha sido aceptado para su publicación en el número 6 Vol. 150 de nuestra revista Gaceta Médica de México.

Agradeciéndole su interés en nuestra publicación, aprovechamos la oportunidad para enviarle un cordial saludo

Atentamente

**Dr. Alberto Lifshitz**  
Editor

**Editores Asociados**

Dr. José Hálabe Cherem  
Dr. Manuel Ramiro H.

### ARTÍCULO 3.

#### Detección de *Borrelia burgdorferi* en garrapatas, perros y humanos.

Escárcega Ávila Angélica M\*, Tinoco Gracia Luis, Field Cortazares Jorge, Barreras Serrano Alberto, Guzmán Trejo José Antonio. Morales Trejo Adriana.

Universidad Autónoma de Baja California- Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias.

#### RESUMEN

La enfermedad de Lyme es causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, en la signología se incluye: cutánea, eritema migrante, fatiga, artralgia, mialgia, cefalea, fiebre, adenopatía, rigidez del cuello por neuritis craneal y meningitis linfocítica. Entre los vectores de esta enfermedad se destacan: *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificu*, *I. neotomae*, *Amblyomma americanum* y *Dermacentor variabilis*, *D. occidentalis*, en Mexicali Baja California se han encontrado evidencias serológicas y moleculares de la presencia de la espiroqueta *B. burgdorferi* en perros de la ciudad. Sin embargo se desconoce la presencia de algún vector de la enfermedad en la ciudad y sus alrededores, por lo tanto el objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de la espiroqueta en humanos, perros y garrapatas *R. sanguineus* de la ciudad de Ensenada Baja California. Se colectaron 384 muestras de humanos, 32 perros con signología clínica sugerente a Borreliosis y 11 garrapatas procedentes de la Cd. de Ensenada. Para su análisis se realizó la extracción de DNA del total de las muestras con el Kit comercial Qiagen siguiendo las indicaciones del fabricante. Para realizar el PCR de punto final, se utilizaron iniciadores específicos para el género de *Borrelia burgdorferi* sensu lato y *Borrelia burgdorferi* sensu stricto y el análisis de los productos de PCR se observaron en geles de agarosa al 1%. Los Resultados de PCR de humanos fueron negativos en su totalidad, en cuanto a perros 21% (7/32) resultaron positivos a la técnica de PCR utilizando los iniciadores *FLA* para *Borrelia burgdorferi* sensu lato y el 31% (10/32) resultado positivo a la técnica cuando se utilizaron los iniciadores *BB* específicos para *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, el 36%(4/11) de las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* resultaron positivas a la técnica de PCR utilizando los iniciadores *FLA* y el 54% (6/11) utilizando los iniciadores *BB*. La identificación molecular de la bacteria en perros y garrapatas mostró una homología con *Borrelia burgdorferi* del 95% y 92% respectivamente con las secuencias reportadas en el GenBank.

Los casos negativos en humanos pueden deberse a los cortos periodos de estancia de la espiroqueta en torrente sanguíneo además de las bajas probabilidades de ser mordidos por garrapatas a comparación de los perros, en cuanto a los resultados positivos a Borreliosis de los perros y garrapatas (*R. sanguineus*) se sugieren realizar más investigaciones para conocer la participación de *R. sanguineus* como vector de la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de borreliosis o enfermedad de Lyme se describió por primera vez en el continente americano en la comunidad de Lyme, Connecticut, E.U.A, en 1972 (Steere et al., 1977) el agente etiológico *Borrelia burgdorferi* fue aislado por primera vez por Willy Burgdorfer en 1982 (Burgdorfer, 1984; Dunlop and Williams, 1996; Manley, 1996) la cual es una bacteria patógena que infecta un rango amplio de especies de vertebrados, que involucra diversos mamíferos incluyendo a los humanos, aves, y a varias especies de garrapatas, (Faul et al., 1999; Straubinger, 2000). En humanos la enfermedad de Lyme es multisistémica e inflamatoria, en la forma temprana se manifiesta por erupción cutánea, eritema migrante, fatiga, artralgia, mialgia, cefalea, fiebre, adenopatía, rigidez del cuello por neuritis craneal y meningitis linfocítica. También puede producir varios grados de bloqueo atrioventricular y complicaciones respiratorias. En la forma crónica se presenta artritis crónica, afección crónica del sistema nervioso, dermatitis crónica, queratitis y encefalopatías que pueden persistir por más de 10 años (Berglund et al., 1995; Burgess, 1986; Edlow, 1999; Faul et al., 1999; Magnarelli et al., 1987; Smith et al., 2002; Spach et al., 1993). También puede presentar signos renales como azotemia, proteinuria, cilindruria, piuria y hematuria (Grauer et al., 1988). Se ha demostrado que el perro es el reservorio más importante de esta espiroqueta en el ambiente domiciliario por ello es considerado como centinela de la enfermedad (Hanincová et al., 2006).

La bacteria causante de la enfermedad es una espiroqueta que mide de 20 a 30µ de largo por 0.2 a 0.3µ de ancho y tiene de 7 a 11 flagelos (Barbour y Hayes, 1986; Greene et al., 2000). Los vectores y hospederos de esta bacteria descritos en la actualidad son los siguientes: *Ixodes scapularis* (Burgdorfer, 1984; Burgdorfer et al., 1985; Escudero et al., 2000; Liveris et al., 1999; Qiu et al., 2002; Steere et al., 1983; Thomas et al., 2001; Varde et al., 1998; Yoshinari et al., 2003), *I. pacificus*

(Burgdorfer, 1984; De Silva et al., 1999), *I. ricinus* (Ramamoorthy and Philipp, 1998), *I. neotomae* (Lane and Pascoello, 1989), *Amblyomma americanum* y *Dermacentor variabilis*, *D. occidentalis* (Spach et al., 1993); siendo los mejores vectores las garrapatas *I. scapularis* e *I. pacifius*.

Actualmente no existe evidencia científica que compruebe la participación de *Rhipicephalus sanguineus* como vector de esta espiroqueta (Baptista et al., 2004; Bernasconi et al., 1997; Bouattour et al., 1999; Costa et al., 2002; Filippova, 1990; Kurtti et al., 1993; Luckhart et al., 1991; Merino et al., 2005; Miserez et al., 1990; Munderloh et al., 1993; Nebreda Mayoral et al., 2004; Sanogo et al., 2003; Walker et al., 1998). A pesar que no existe evidencia científica que demuestre la participación de *R. sanguineus* como vector de esta enfermedad, existen reportes de seroprevalencia de la enfermedad en perros de la Cd. de Mexicali Baja California. Romano y colaboradores reportan una seroprevalencia en perros del 6% (30/2) en un estudio piloto realizado en 1998. Otro estudio piloto realizado en la misma ciudad reporta una seroprevalencia del 8.2% (94/7) en ambos estudios el 100% de las garrapatas encontradas fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología como *R. sanguineus* (Tinoco-Gracia et al., 2007). La garrapata *R. sanguineus* se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Puede establecerse en las paredes y muebles de hogares, y en perreras, es considerada como la garrapata de ciudad ya que tiene la habilidad de adaptarse fácilmente a estas condiciones.

## **OBJETIVOS**

En base a lo descrito anterior, el objetivo del presente trabajo es la identificación de *Borrelia burgdorferi* en garrapatas del género *R. sanguineus*, en perros con signología clínica a borreliosis y en humanos de la ciudad de Ensenada Baja California, utilizando la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## **DESARROLLO**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Salud Pública del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. Se incluyeron 32 muestras de perros; 12 procedentes de clínicas veterinarias y 11 muestras de garrapatas del género *R. sanguineus*. También se incluyeron 385 muestras de humanos de la ciudad de Ensenada Baja California México. Las muestras de sangre de perros fueron colectadas por Médicos

Veterinarios capacitados para la toma de muestras, se utilizaron tubos con EDTA (etilen diamino tetra acético) para la prueba de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). En el caso de las muestras de humanos fueron recolectadas por estudiantes de la carrera de Médico Cirujano de la Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada, siguiendo los lineamientos que en materia de investigación y ética se establecen en la declaración de Helsinki (1964). Participaron en el estudio humanos mayores de 1 año de edad, sin distinción de sexo, firmando una carta de conformidad de participar en el estudio, en el caso de niños, los padres y/o tutores autorizaron su participación, al igual q en los perros se tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA.

Las extracciones de DNA de sangre de perros y humanos se realizaron con el kit comercial Qiagen siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción de DNA de garrapatas se realizó de la siguiente manera: Se diseccionaron las garrapatas para extraer intestinos y glándula salivales, estos se mantuvieron por 24 hrs a 56°C en buffer ATL del kit comercial Qiagen y proteinasa K del mismo Kit, una vez transcurridas las 24 horas se procedió a seguir las indicaciones del kit para la extracción de DNA de tejido. Para comprobar el éxito de las extracciones de DNA se colocaron 5 µl de DNA y 1 µl de loading buffer de la marca Promega en geles de agarosa al 1%.

Para la realización de la técnica de PCR de las muestras se utilizaron los siguientes iniciadores:

**Para flagelina de *Borrelia burgdorferi sensu lato*:**

FLA 107 (5'TTA ATC GAG CTT CTG ATG ATG CTG C3')

FLA 335 (5'ATT TCG TCT GTA AGT TGC TCT ATT TCA A3')

**Para 16S rRNA de *Borrelia burgdorferi sensu stricto***

73348-B (BB) = (5'GGGATGTAGCAATACATTC 3')

73349-B (BB) = (5'ATATAGTTTCCAACATAGG 3')

El inicio de PCR fue con un calentamiento de 95°C por 15 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización de 94°C por 45 s, hibridación de 52°C por 45 s y extensión de 72°C por 1 min. Después de los 45 ciclos, se hizo una extensión adicional de 72°C por 7 min.

## RESULTADOS

Los resultados de PCR de las muestras de perros y garrapatas se observan en el cuadro 1 y 2 respectivamente, en el caso de humanos todas las muestras resultaron negativas a PCR utilizando los dos juegos de iniciadores (*FLA* y *BB*).

Cuadro 1. Resultados de PCR en perros, utilizando los iniciadores *FLA* y *BB*

PERROS		
Números	FLA	BB
1	-	+
2	-	-
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	+	+
13	-	+
14	-	-
15	-	-
16	-	+
17	-	-
18	-	-
19	+	-
20	+	-
21	-	-
22	+	-
23	+	-
24	+	-
25	-	-
26	+	-

27	-	+
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	+
32	-	-

Cuadro 2.- Resultados de PCR en garrapatas *R. sanguineus*, utilizando los iniciadores *FLA* y *BB*.

**GARRAPATAS**

<b>Muestra</b>	<b>FLA</b>	<b>BB</b>
1	+	+
2	+	+
3	-	-
4	-	-
5	-	+
6	+	-
7	+	+
8	-	-
9	-	+
10	-	+
11	-	-

**CONCLUSIONES**

Se obtuvieron resultados positivos a la técnica de PCR tanto en perros como en garrapatas del genero *R. sanguineus*, cabe mencionar que no se detectó la presencia de otro vector en la ciudad de Ensenada Baja California, por lo tanto se sugiere realizar más investigaciones para describir la participación de *R. sanguineus* como vector y portador de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Los casos negativos en humanos pueden deberse a los cortos periodos de estancia de la espiroqueta en torrente sanguíneo, ya que usualmente esta migra a vejiga y a articulaciones donde puede perdurar por años, además de la escasa exposición al vector a comparación de los perros, los cuales son huéspedes predilectos de la garrapata *R. sanguineus*.

## LITERATURA CITADA

- Baptista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M., Collares-Pereira, M., 2004, Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 109-116.
- Berglund, J., Eitrem, R., Ornstein, K., Lindberg, A., Ringner, A., Elmrud, H., Carlsson, M., Runehagen, A., Svanborg, C., Norrby, R., 1995, An Epidemiologic Study of Lyme Disease in Southern Sweden. *N. Engl. J. Med.* 333, 1319-1324.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Balmelli, T., Peter, O., Piffaretti, J.C., 1997, Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. *Eur J Epidemiol* 13, 209-215.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A., Daoud, A., 1999, Distribution and ecology of ticks (Acari: Ixodidae) infesting livestock in Tunisia: an overview of eighth years field collections. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 5-10.
- Burgdorfer, W., 1984, Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 57, 515-520.
- Burgdorfer, W., Lane, R.S., Barbour, A.G., Gresbrink, R.A., Anderson, J.R., 1985, The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. *Am J Trop Med Hyg* 34, 925-930.
- Burgess, E.C., 1986, Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 263, 49-54.
- Caimano, M.J., Eggers, C.H., Gonzalez, C.A., Radolf, J.D., 2005, Alternate Sigma Factor RpoS Is Required for the In Vivo-Specific Repression of *Borrelia burgdorferi* Plasmid Ip54-Borne ospA and Ip6.6 Genes. *J. Bacteriol.* 187, 7845-7852.
- Costa, I.P., Bonoldi, V.L., Yoshinari, N.H., 2002, Search for *Borrelia* sp. in ticks collected from potential reservoirs in an urban forest reserve in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: a short report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 631-635.
- De Lacerda, A.A., Cunha, M.R., Antunes, D.R., Do, N.C.F., Machado, B.R., 2004, Frequency of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs from the metropolitan region of Rio de Janeiro. *Pesq Vet Bras* 24 Oct/Dec.

- De Silva, A.M., Zeidner, N.S., Zhang, Y., Dolan, M.C., Piesman, J., Fikrig, E., 1999, Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect Immun* 67, 30-35.
- Dinglasan, R.R., Jacobs-Lorena, M., 2005, Insight into a Conserved Lifestyle: Protein-Carbohydrate Adhesion Strategies of Vector-Borne Pathogens. *Infect. Immun.* 73, 7797-7807.
- Dunlop, R.H., Williams, D.J., 1996, Emerging zoonoses and the insecure species barrier. *Veterinary Medicine an Illustrated History*, 580-581.
- Edlow, J.A., 1999, Lyme disease and related tick-borne illnesses. *Ann Emerg Med* 33, 680-693.
- Escudero, R., Barral, M., Perez, A., Vitutia, M.M., Garcia-Perez, A.L., Jimenez, S., Sellek, R.E., Anda, P., 2000, Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 38, 4026-4033.
- Faul, J.L., Doyle, R.L., Kao, P.N., Ruoss, S.J., 1999, Tick-borne pulmonary disease: update on diagnosis and management. *Chest* 116, 222-230.
- Filippova, N.A., 1990, [The taxonomic aspects of the transmission of the causative agent of Lyme disease]. *Parazitologiya* 24, 257-267.
- Grauer, G.F., Burgess, E.C., Cooley, A.J., Hagee, J.H., 1988, Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 193, 237-239.
- Hovius, J.W.R., Ramamoorthi, N., van't Veer, C., de Groot, K.A., Nijhof, A.M., Jongejan, F., van Dam, A.P., Fikrig, E., 2007, Identification of Salp15 Homologues in *Ixodes ricinus* Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7, 296-303.
- Jacobs, P.A., Fourie, L.J., Horak, I.G., 2004, A laboratory comparison of the life cycles of the dog ticks *Haemaphysalis leachi* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Onderstepoort J Vet Res* 71, 15-28.
- Korshus, J.B., Munderloh, U.G., Bey, R.F., Kurtti, T.J., 2004, Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto using *Ixodes scapularis* ticks artificially infected by capillary feeding. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 193, 27-34.
- Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Krueger, D.E., Johnson, R.C., Schwan, T.G., 1993, Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia*

- burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity. J Med Entomol 30, 586-596.
- Lane, R.S., Pascocello, J.A., 1989, Antigenic characteristics of *Borrelia burgdorferi* isolates from ixodid ticks in California. J. Clin. Microbiol. 27, 2344-2349.
- Liveris, D., Varde, S., Iyer, R., Koenig, S., Bittker, S., Cooper, D., McKenna, D., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., Schwartz, I., 1999, Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. J Clin Microbiol 37, 565-569.
- Luckhart, S., Mullen, G.R., Wright, J.C., 1991, Etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, detected in ticks (Acari: Ixodidae) collected at a focus in Alabama. J Med Entomol 28, 652-657.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Schreier, A.B., Ficke, C.M., 1987, Clinical and serologic studies of canine borreliosis. J Am Vet Med Assoc 191, 1089-1094.
- Manley, P.A., 1996, Enfermedad de Lyme. Manual Clínico de Pequeñas Especies, Vol 2. McGraw-Hill Interamericana, Mexico, D.F., 1320-1321 pp.
- Marquez-Jimenez, F.J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodriguez-Liebana, J.J., Muniain-Ezcurra, M.A., 2005, [Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain.]. Enferm Infecc Microbiol Clin 23, 94-102.
- Merino, F.J., Nebreda, T., Serrano, J.L., Fernandez-Soto, P., Encinas, A., Perez-Sanchez, R., 2005, Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. Epidemiol Infect 133, 943-949.
- Miserez, V., Gern, L., Aeschlimann, A., 1990, *Borrelia burgdorferi* in ticks of the Canton Tessin (Switzerland). Parasitologia 32, 293-299.
- Munderloh, U.G., Park, Y.J., Doh, J.M., Fallon, A.M., Kurtti, T.J., 1993, Plasmid modifications in a tick-borne pathogen, *Borrelia burgdorferi*, cocultured with tick cells. Insect Mol Biol 1, 195-203.
- Nebreda Mayoral, T., Merino, F.J., Serrano, J.L., Fernandez-Soto, P., Encinas, A., Perez-Sanchez, R., 2004, Detection of antibodies to tick salivary antigens among patients from a region of Spain. Eur J Epidemiol 19, 79-83.
- Policastro, P.F., Schwan, T.G., 2003, Experimental infection of *Ixodes scapularis* larvae (Acari: Ixodidae) by immersion in low passage cultures of *Borrelia burgdorferi*. J Med Entomol 40, 364-370.

- Qiu, W.G., Dykhuizen, D.E., Acosta, M.S., Luft, B.J., 2002, Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. *Genetics* 160, 833-849.
- Ramamoorthy, R., Philipp, M.T., 1998, Differential expression of *Borrelia burgdorferi* proteins during growth in vitro. *Infect Immun* 66, 5119-5124.
- Sanogo, Y.O., Parola, P., Shpynov, S., Camicas, J.L., Brouqui, P., Caruso, G., Raoult, D., 2003, Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann N Y Acad Sci* 990, 182-190.
- Schwan, T.G., Piesman, J., 2000, Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. *J. Clin. Microbiol.* 38, 382-388.
- Smith, R.P., Schoen, R.T., Rahn, D.W., Sikand, V.K., Nowakowski, J., Parenti, D.L., Holman, M.S., Persing, D.H., Steere, A.C., 2002, Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. *Ann Intern Med* 136, 421-428.
- Spach, D.H., Liles, W.C., Campbell, G.L., Quick, R.E., Anderson, D.E., Fritsche, T.R., 1993, Tick-Borne Diseases in the United States. *N. Engl. J. Med.* 329, 936-947.
- Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Kornblatt, A.N., Craft, J.E., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Schmid, G.P., Johnson, E., Malawista, S.E., 1983, The spirochetal etiology of Lyme disease. *The New England journal of medicine* 308, 733-740.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M., 1977, Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis and rheumatism* 20, 7-17.
- Straubinger, R.K., 2000, PCR-Based Quantification of *Borrelia burgdorferi* Organisms in Canine Tissues over a 500-Day Postinfection Period. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2191-2199.
- Szabo, M.P., Mangold, A.J., Joao, C.F., Bechara, G.H., Guglielmone, A.A., 2005, Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the

- Rhipicephalus sanguineus tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary parasitology* 130, 131-140.
- Thomas, V., Anguita, J., Barthold, S.W., Fikrig, E., 2001, Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis. *Infect Immun* 69, 3359-3371.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero, M.M.T., Rentería-Evangelista, T.B., Barreras-Serrano, A., Hori-Oshima, S., López-Valencia, G., Tamayo-Sosa, A.R., Quezada-Íñiguez, V.A., Moro, M., Vinasco, J., 2007, Seroprevalence of Ehrlichia canis in dogs from a Mexico-U.S. border desert region: pilot study. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6, 758-760.
- Varde, S., Beckley, J., Schwartz, I., 1998, Prevalence of tick-borne pathogens in Ixodes scapularis in a rural New Jersey County. *Emerg Infect Dis* 4, 97-99.
- Walker, E.D., Stobierski, M.G., Poplar, M.L., Smith, T.W., Murphy, A.J., Smith, P.C., Schmitt, S.M., Cooley, T.M., Kramer, C.M., 1998, Geographic distribution of ticks (Acari: Ixodidae) in Michigan, with emphasis on Ixodes scapularis and Borrelia burgdorferi. *J Med Entomol* 35, 872-882.
- Wang, G., van Dam, A.P., Schwartz, I., Dankert, J., 1999a, Molecular typing of Borrelia burgdorferi sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12, 633-653.
- Wang, I.N., Dykhuizen, D.E., Qiu, W., Dunn, J.J., Bosler, E.M., Luft, B.J., 1999b, Genetic diversity of ospC in a local population of Borrelia burgdorferi sensu stricto. *Genetics* 151, 15-30.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E., Zumstein, G., 1993, An OspA serotyping system for Borrelia burgdorferi based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 31, 340-350.
- Yoshinari, N.H., Abrao, M.G., Bonoldi, V.L., Soares, C.O., Madruga, C.R., Scofield, A., Massard, C.L., da Fonseca, A.H., 2003, Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 311-318.

## CONCLUSIONES GENERALES

Con los resultados obtenidos, se demostró que existe evidencia serológica de rickettsiosis en humanos 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.

Se logró identificar un fragmento de ADN de la bacteria *Rickettsia rickettsii* tanto en perros como en garrapatas lo que sugiere que los sujetos positivos serológicamente estuvieron expuestos a *Rickettsia rickettsii*.

Se obtuvieron resultados positivos a *Borrelia burgdorferi* mediante la técnica de PCR tanto en perros como en garrapatas del género *R. sanguineus*, cabe mencionar que no se detectó la presencia de otro vector en la ciudad de Ensenada Baja California, por lo tanto se sugiere realizar más investigaciones para describir la participación de *R. sanguineus* como vector y portador de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*. Los casos negativos en humanos pueden deberse a los cortos periodos de estancia de la espiroqueta en torrente sanguíneo, ya que usualmente esta migra a vejiga y ha articulaciones donde puede perdurar por años, además de la escasa exposición al vector a comparación de los perros, los cuales son huéspedes predilectos de la garrapata *R. sanguineus*. Al igual que la fiebre manchada de las montañas rocosas la enfermedad de Lyme es una enfermedad zoonótica por lo tanto debe notificarse a las autoridades del sector salud para que sea incluida en los diagnósticos diferenciales.