

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA PARA RIQUETSIOSIS (*R. rickettsii*) Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES DE RIESGO EN PERROS DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA**

TESIS

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

PRESENTA

MYRNA ROMANO OSUNA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA MEXICO

MARZO 2011

**Estimación De La Prevalencia Para Riquetsiosis (*R. Rickettsii*) Y Su Asociación Con Factores De Riesgo En Perros De Mexicali, Baja California. Tesis Presentada por Myrna Romano Osuna Como Requisito Parcial Para Obtener El Grado De Maestro En Ciencias Veterinarias, Que Ha Sido Aprobada Por El Comité Parcial Indicado:**



---

Dr. Luis Tinoco Gracia  
Director



---

Dr. Alberto Barreras Serrano  
Asesor



---

Dr. Gilberto López Valencia  
Asesor

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor y amigo Dr. Luis Tinoco Gracia, gracias Luis por hacerme parte en este proyecto, por todas las enseñanzas que me diste durante este tiempo, por tu paciencia y entrega.

Al Dr. Alberto Barreras Serrano, Inge gracias por todos los consejos que me brindaste, por confiar en mi y por siempre tener una palabra de aliento en los momentos más difíciles.

Al Dr. Gilberto López Valencia, gracias amigo por tu entrega incondicional para la realización de esta tesis, por tus consejos, por alegrarme los momentos tristes con tus chistes, por estar al pendiente de mi.

Al Gobierno Municipal de Mexicali y Centro Municipal de Control Animal, que financiaron el proyecto, así como al Colegio de Médicos Veterinarios en Pequeñas Especies de Mexicali, A. C. y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

A Julieta y Angélica gracias por su ayuda incondicional, por sus comentarios, por sus consejos. Hicimos buen equipo!

## DEDICATORIA

A Dios por poner en mi camino a las personas adecuadas para poder cumplir uno de mis objetivos profesionales. Gracias Señor por tus bendiciones. A María por cuidarme, protegerme y por darme la virtud de la paciencia.

A mi marido Waldemar, por estar siempre al pie del cañón en mis proyectos, por estar pendiente durante todas las noches largas de estudio, por tu comprensión, por tu amor, por tus palabras de aliento. Gracias por estar conmigo: Te amo!!

A mis padres Isaías y Vicky, por todos los valores que me enseñaron, por enseñarme el amor al estudio y a la superación personal y profesional, a no sentirme derrotada ante la adversidad si no al contrario por darme las herramientas necesarias para poder salir triunfante de ella. Los quiero con todo el alma. Este éxito también es de ustedes. Vickita lo logamos!

A mis hermanos Lily, Raúl y Rafael por todas las porras que me dieron, por estar presentes en mi vida. Los quiero mucho. ¿Quién se va a parecer a la tía?

A mis hermanos en Cristo: Pbro. Alfonso, Lourdes, Coty, Claudia, Karla, Carlota, Toñita, Marivel, Jorge, Caro, Beto, Oyuki, Moises, Lucy, Oscar y Ricardo, gracias por sus oraciones y por ser parte de mi vida.

A Sra. Aída, Celina, Georgina, Chuyita, Angel y Alberto por la paciencia y comprensión que me tuvieron en estos 2 años.

## RESUMEN

### **Estimación de la prevalencia para rickettsiosis (*R. rickettsii*) y su asociación con factores de riesgo en perros de Mexicali, Baja California**

Se analizaron un total de 1,536 muestras sanguíneas de perros, distribuidas en dos periodos, el primero fue durante el 2005 y 2006 y el segundo en el 2009, para la detección de títulos de anticuerpos IgG contra *R. rickettsii* utilizando el método de ELISA. La seroprevalencia general ajustada para rickettsiosis fue de 73.6% (95% IC 67.9-72.6). En el primer periodo se observó una seroprevalencia del 77% (95% IC 73.8-80.1) y en el segundo periodo del 66.6% (95% IC 60.0-67.1). Se evaluaron 25 factores asociados ( $P < 0.05$ ) a la enfermedad, los cuales fueron obtenidos mediante OR, éstos se dividieron en: los relacionados con el perro, con el medio ambiente y con la sociedad. Los perros que se desplazan a la calle mostraron 1.7 mayor riesgo de presentar la enfermedad, el no cumplir con un programa preventivo contra las garrapatas tiene 2.3 mayor riesgo, la edad resultó significativamente asociado ya que los perros mayores a 1 año tuvieron mayor riesgo, los valores oscilaron de 5.6 a 10.9, los machos tuvieron de 1.6 a 2.1 mayor riesgo que las hembras y los de talla mediana a grande tuvieron de 1.8 al 3.8 mayor riesgo que los de talla chica. Estos resultados sugieren que rickettsiosis puede ser endémica en esta región.

**Palabras claves:** *Rickettsia rickettsii*-Fiebre de las Montañas Rocallosas-Seroprevalencia-ELISA-Factores de riesgo.

## ABSTRACT

### **Estimated prevalence and the associate risk factors for rickettsia infection (*R. rickettsii*) in dogs in Mexicali, Baja California**

This study evaluated 1,536 serum of dogs. The samples were distributed in two periods: the first one in 2005-2006 and the second one in 2009. These samples were tested for the seroreactivity against IgG titles for *R. rickettsii* using ELISA assay. The seroprevalence in the first period was 77.4% (95% IC 69.3-78.5%) and in the second period was 66.6% (95% IC 60.0-67.1). 25 risk factors associated ( $P < 0.05$ ) to the infection were evaluated, they were obtained by OR and were divided in: canine ecology, social and environmental factors. The risk factors associated to rickettsia infection were roaming of the dogs, not having a tick preventive program, age, size and sex. This results suggest that Rocky Mountain Spotted Fever may be endemic in this region.

**Key words:** *Rickettsia rickettsii*-Rocky mountain spotted fever-Seroprevalence-ELISA-Risk factors.

# CONTENIDO

	Pág
Lista de Cuadros .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Introducción .....	1
Revisión de Literatura .....	3
<i>Antecedentes</i> .....	3
<i>Etiología</i> .....	4
<i>Transmisión</i> .....	4
<i>Patogenia</i> .....	5
<i>Factores de riesgo</i> .....	6
<i>Diagnóstico</i> .....	8
<i>Serología</i> .....	8
<i>Detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta</i> ...	9
<i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas</i> .....	13
<i>Métodos moleculares</i> .....	15
<i>Prueba de reacción en cadena de la polimerasa convencional</i> .	15
<i>Cultivo</i> .....	20
Materiales y Métodos .....	22
<i>Localización</i> .....	22

<i>Tamaño muestral</i> .....	23
<i>Criterios de inclusión</i> .....	24
<i>Criterios de exclusión</i> .....	24
<i>Muestreo</i> .....	25
<i>Análisis serológico</i> .....	25
<i>Seroprevalencia</i> .....	26
<i>Pruebas moleculares</i> .....	26
<i>Factores asociados</i> .....	27
<i>Asociación de factores y seroprevalencia</i> .....	31
<i>Análisis estadístico</i> .....	31
Resultados .....	32
<i>Seroprevalencia</i> .....	32
<i>Periodo 1 (2005-2006)</i> .....	34
<i>Clínicas veterinarias de la zona urbana</i> .....	34
<i>Centro de control animal</i> .....	35
<i>Periodo 2 (2009)</i> .....	36
<i>Zona rural</i> .....	36
<i>Zona urbana</i> .....	37
<i>Diagnóstico molecular</i> .....	38
Discusión .....	40
<i>Seroprevalencia</i> .....	40



<i>Factores de riesgo</i> .....	42
<i>Diagnóstico molecular</i> .....	45
Conclusiones .....	46
Recomendaciones .....	47
Literatura Citada .....	48

## Lista De Cuadros

Cuadro		Pág
1	Iniciadores utilizados para la identificación de genes riquetsiales .....	17
2	Cuestionario aplicado en clínicas veterinarias .....	28
3	Cuestionario aplicado en el centro de control animal .....	30
4	Seroprevalencia entre clínicas veterinarias y centro control animal .....	33
5	Seroprevalencia entre la zona rural y zona urbana .....	33
6	Seroprevalencia entre periodo 1 y periodo 2 .....	34
7	Factores de riesgo asociados a <i>R. rickettsii</i> en clínicas veterinarias en el periodo 1 .....	35
8	Factores de riesgo asociados a <i>R. rickettsii</i> en el centro de control animal periodo 1 .....	36
9	Factores de riesgo asociados a <i>R. rickettsii</i> en zona rural periodo 2 .....	37
10	Factores de riesgo asociados a <i>R. rickettsii</i> en zona urbana periodo 2 .....	38

## Lista De Figuras

Figuras		Pág
1	Promedio de temperaturas máximas y mínimas por estación del año .....	22
2	Distribución de muestras sanguíneas .....	24
3	Muestras seropositivas .....	26
4	Seroprevalencia general y su distribución .....	32
5	PCR de 17-kDa de <i>R. rickettsii</i> en sangre de perros seropositivos .....	39

## INTRODUCCIÓN

La fiebre manchada de las montañas rocallosas es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*. En estudios realizados a nivel mundial la prevalencia de rickettsiosis ocasionada por *R. rickettsii* en perros puede ser de hasta el 70% y debido a que es considerada una enfermedad zoonótica, en humanos se han encontrado valores que alcanzan el 40%, inclusive en pacientes no tratados la mortalidad puede observarse en un 30%.

La presentación clínica de esta enfermedad es poco específica lo que puede llevar a la confusión en el diagnóstico diferencial con otras infecciones análogas como, dengue, leptospirosis, influenza, fiebre tifoidea, entre otras, en áreas endémicas del país. Los síntomas y signos son variados y dependen del órgano axial afectado, como de la liberación de citoquinas en el torrente sanguíneo (Anaya et al., 2007).

El reto del clínico es el de realizar un diagnóstico preciso y rápido a través de pruebas diagnósticas. Estas son empleadas para la detección de las *Rickettsia* sp las cuales a la vez son utilizadas para la confirmación de la enfermedad. Entre las pruebas que se utilizan están las pruebas serológicas, técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el cultivo de la *Rickettsia* sp.

Esta enfermedad es considerada como emergente y no ha sido erradicada en ningún lugar del mundo ya que persisten focos endémicos y epidémicos, los cuales están relacionados con la distribución geográfica de los hospedadores y vectores. Es importante determinar los factores de riesgo asociados a la enfermedad, los cuales se pueden dividir en los relacionados con las mascotas, el medio ambiente y la sociedad, esto nos permitirá desarrollar acciones concretas como control de plagas, mejora de la vivienda, tomar medidas higiénicas, disminuir el movimiento de las mascotas fuera de la vivienda y de la ciudad así como realizar visitas periódicas al médico veterinario, las cuales ayudarán a disminuir la transmisión de la enfermedad.

**Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo, es estimar la prevalencia para rickettsiosis (*R. rickettsii*) y su asociación con factores de riesgo en perros de Mexicali, Baja California.**

# Revisión de Literatura

## Antecedentes

La fiebre manchada de las montañas rocallosas (FMMR) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*. El primer estudio data de finales del siglo XVIII donde se reportó una enfermedad febril con alto índice de mortalidad en los colonizadores del Bitterroot Valley al oeste de Montana, Estados Unidos de Norteamérica (EUA). Howard Taylor Ricketts confirmó que esta enfermedad era transmitida por una bacteria, razón por la cual recibió su nombre (Karpathy et al., 2007).

Los principales vectores de FMMR son *Dermacentor andersoni* (garrapata del bosque), la cual se localiza en las Montañas Rocallosas, *Dermacentor variabilis* (garrapata americana), al Este de las grandes planicies, en la costa Atlántica y en la costa oeste, *Rhipicephalus sanguineus* (garrapata café del perro), localizada en México y *Amblyomma americanum* (estrella americana solitaria), en Centro y Sudamérica. (Rodgers et al., 1989; Walker, 1989).

## Etiología

Las bacterias del orden Rickettsiales, familia *Rickettsiaceae* y género *Rickettsia* son organismos bacterianos que son parásitos intracelulares obligados. Son cortos, de forma cocobacilar, gram negativos de 0.8 a 2.0 µm de diámetro, aeróbicos y se dividen por fisión binaria (Yu et al., 2005).

El género *Rickettsia* está clasificado en base a la presencia de proteínas de superficie inmunodominantes *ompA* y *ompB* (proteínas externas de membrana A y B) permitiendo la diferenciación en dos grupos: el grupo de fiebre manchada el cual incluye *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. mongolotimonae*, *R. slovacae*, *R. akari*, *R. japonica*, *R. sibirica*, *R. africae*, *R. helvetica*, *R. australis*, y *R. honei* y el grupo tifus que incluye *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. bellii*, *R. canadensis* y *R. felis* (Yu et al., 2005, Anaya et al 2007).

### **Transmisión**

Las garrapatas pueden adquirir *Rickettsia* sp por transmisión transovárica. Debido a que las garrapatas de la familia *Ixodidae* solamente se alimentan una vez en cada etapa de vida, las rickettsias adquiridas durante la alimentación con sangre de un hospedador rickettsémico o por medio de la ruta transovárica pueden ser transmitidas a otro hospedador siempre y cuando la garrapata haya mudado a su siguiente estado larvario e inicie su alimentación. Cuando la *Rickettsia* sp es transmitida eficientemente tanto transestadial (paso secuencial de parásitos adquiridos durante una etapa de vida o estadio, durante la muda a la próxima etapa o estadio) como transováricamente, la garrapata va a servir como reservorio de la bacteria y la distribución de la rickettsiosis va a ser similar a la de su hospedador (Parola et al., 2005).

Después de la fagocitosis y la internalización, la vacuola fagocítica es lisada rápidamente escapando así de la digestión fagocítica para poder multiplicarse en el citoplasma celular y núcleo del hospedador de las células endoteliales (Parola et al., 2005). Heinzen et al., (1993) demostraron que las

*Rickettsia* sp inducen una polimerización de la actina y sugieren que ésta juega un papel importante en la movilidad intracelular de diseminación de célula a célula.

### **Patogenia**

La bacteria *R. rickettsii* entra al cuerpo a través de la mordedura de una garrapata infectada. Las rickettsias se diseminan vía el sistema circulatorio e invaden y se replican en las células endoteliales de las pequeñas arterias y las vénulas. Debido al daño ocasionado a las células endoteliales se inicia una vasculitis con la activación plaquetaria y activación del sistema hemostático acompañado por una disminución en los niveles plasmáticos de antitrombina III y plasminógeno y un incremento en los productos de degradación del fibrinógeno y fibrina (Greene et al., 1998).

La pérdida de líquidos y electrolitos del compartimento vascular a los espacios extravasculares ocasiona un edema y colapso vascular. La necrosis vascular permite la extravasación de sangre lo que conlleva al eritema característico en la piel y a las hemorragias petequiales (Swango et al., 1989).

*R. rickettsii* provoca una enfermedad sistémica de moderada a severa en sus hospedadores, causando lesiones irreversibles y letales al endotelio de la dermis, pulmones, corazón, riñones, tracto gastrointestinal, cerebro y músculo esquelético (Masters et al., 2003).



## **Factores de riesgo**

Los factores de riesgo asociados para la transmisión de la enfermedad son: la preferencia al hospedador en los diferentes estadios de las garrapatas, el grado de contacto entre el hospedador y la garrapata, susceptibilidad de hospedadores preferidos por la bacteria, condiciones ambientales y la inmunidad del hospedador (Parola et al., 2001).

Más del 90% de los pacientes con FMRR se infectan durante los meses de abril a septiembre, por un incremento en el número de adultos y ninfas de las garrapatas, por lo que se considera de tipo estacional. Las personas que se encuentran en mayor riesgo son los del sexo masculino y los niños; esto es debido a la exposición frecuente con los perros y aquellos que viven en áreas boscosas o con abundante pasto (Walker, 1989, Masters et al., 2003).

Se realizó un estudio en Argentina donde se asociaron los siguientes factores con la parasitosis de humanos con garrapatas; infestación de garrapatas en humanos en los últimos 12 meses (variable dependiente) y año, ciudad, estrato socioeconómico y número de perros en los hogares (variables independientes). El 6.6% de los individuos manifestaron haber estado alguna vez infestados con garrapatas; donde se observó un mayor nivel de infestación en humanos en relación inversa con el nivel socioeconómico del barrio. No se observaron asociaciones significativas entre la presencia de perros y la infestación en humanos (Gervasoni et al., 2003).

Comer et al (2001) detectó una prevalencia del 7.7%. Dicho estudio se llevo a cabo bajo las siguientes condiciones, se muestrearon 311 perros de diferentes municipios de la ciudad de Nueva York, EEUU., donde se les proporcionó a los propietarios un cuestionario que comprendían preguntas acerca de la edad y origen del perro, como también si el perro tiene acceso al parque, si había viajado fuera del área de Nueva York, utiliza repelente contra garrapatas, historia de garrapatas y seropositividad a otras enfermedades transmitidas por garrapatas. El método de diagnóstico utilizado fue un paquete comercial mediante la técnica de ELISA. Los factores de riesgo que tuvieron significancia estadística fueron: los perros con historia de garrapatas y los perros adultos. Los autores concluyeron que la seropositividad encontrada podría deberse a la reacción cruzada compartida con otras especies de rickettsia, principalmente la *R. akarii*, ya que el vector predominante en la zona es el ácaro del ratón casero, éste tiene poca afinidad al perro como hospedador.

Saito et al (2008), realizaron un estudio en 389 perros donde se llenó un cuestionario con el propósito de obtener información acerca de las variables independientes que pudieran resultar asociadas con la seroreactividad a *Rickettsia* spp (variable dependiente). Los factores de riesgo (variables independientes) a evaluar fueron los siguientes: edad, sexo, número de perros en rancho o casa, lugar donde viven (urbana o rural), si hay contacto directo con bosques o pasturas y utilización del perro. Entre los resultados obtenidos destacan que los perros que tienen contacto directo a pasturas y bosque tienen

2 veces mayor riesgo a ser seroreactivos a *Rickettsia* que los que no tienen contacto. Adicionalmente se observó una asociación significativa en la seroreactividad de *Rickettsia* con los perros viviendo en las zonas rurales y con aquellos utilizados para el pastoreo y caza.

### **Diagnóstico**

Dentro de las pruebas diagnósticas utilizadas para la detección de las *Rickettsia* sp tenemos: las pruebas serológicas, métodos moleculares (técnica de reacción en cadena de la polimerasa) y el cultivo de la *Rickettsia* sp (Chapman et al., 2006).

### **Serología**

Para el diagnóstico empleando las pruebas serológicas se debe de recolectar 10 ml de sangre sin anticoagulante en la etapa temprana de la enfermedad y a los 15 días tomar una segunda muestra (Swango et al., 1989; Brouqui et al., 2004).

La serología se basa en la detección de anticuerpos IgM e IgG. La función primaria de las inmunoglobulinas es la de unirse con los antígenos que han estimulado su producción teniendo como propósito el de eliminarlos. Las moléculas de IgM son las primeras en aparecer cuando hay una respuesta del sistema inmune hacia una estimulación antigénica. Conforme las moléculas de IgG son producidas, los niveles de concentración de IgM disminuyen y permanecen en niveles bajos. Las IgG son producidas durante la respuesta secundaria de anticuerpos (Zane, 2001).

### ***Detección de anticuerpos por Inmunofluorescencia indirecta***

**(IFA):** La inmunofluorescencia se utiliza esencialmente en la detección de anticuerpos contra antígenos de superficie de células. Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes. Se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta (Zane, 2001).

El procedimiento utilizado haciendo uso del paquete *Rickettsia rickettsii* Screen IFA, IgG Antibodies de los Laboratorios Fuller®, para la detección de anticuerpos IgG canino contra *R. rickettsii* es el siguiente: Las laminillas en este kit utilizan cultivo de células propagadas de *R. rickettsii* como sustrato de antígeno. El suero del paciente es diluido 1:64 en un amortiguador fosfatado salino y se incuba en las laminillas individuales para permitir la reacción del anticuerpo del suero con la rickettsia intracelular durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente las laminillas son lavadas con el amortiguador fosfatado salino para remover las proteínas séricas no reactivas y se le agrega el conjugado para que reaccione con los complejos antígeno-anticuerpo y se incuba durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Terminado el tiempo de incubación se le realiza otro lavado con el amortiguador fosfatado salino para remover el conjugado no reactivo. Por último se le agrega una gota de glicerina y se observa al microscopio en objetivo de 40X, comparando el resultado con el control positivo y negativo. El tiempo total aproximado de la técnica es de 90 minutos.

La sensibilidad de IFA depende del periodo de recolección de las muestras. Durante la etapa inicial, la mayoría de las pruebas serológicas van a ser negativas. Se estima que la sensibilidad a partir de los 14 días oscila entre 94 y 100%, y esta sensibilidad aumenta si se realizan pruebas seriadas. Los títulos aumentan para la segunda semana de la enfermedad, los anticuerpos IgM tienden a disminuir después de 3 a 4 meses y los anticuerpos IgG pueden llegar a persistir hasta por 8 meses (Chapman, 2006).

Los anticuerpos IgM e IgG son usados en los estados agudos y convalecientes de la enfermedad. Para los casos sospechosos de las enfermedades del grupo de las fiebres manchadas los títulos del punto de corte de anticuerpos de IgG deben ser  $\geq 64$  y/o títulos de IgM  $\geq 32$  para ser considerados indicativos de infección. Generalmente estos títulos son detectados de 7 a 15 días después del inicio de la enfermedad (Brouqui et al., 2004). También señala que la interpretación de los datos puede confundirse debido a la reacción cruzada que ocurre entre las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.

Un título de 1:64 es considerado el valor mínimo para diagnóstico presuntivo de infección por *Rickettsia* sp. Criterios para un diagnóstico de infección reciente son: a) un aumento del título serológico al cuádruple del valor obtenido con la primera muestra; b) un título mayor o igual de 1:256 en la etapa aguda (Anaya et al., 2007). Las limitaciones que pueda presentar esta técnica puede deberse a la diferencia en la calidad del microscopio, la calidad del conjugado anti-globulina y la habilidad del observador (Walker et al., 1989).

Las reacciones específicas se caracterizan por una mancha intensa, uniforme y aguda fluorescente de forma bacilar presentes en el 10 al 20% del citoplasma de las células en cada campo (Philip et al., 1976).

Un estudio realizado en EUA, por medio de IFA, se reportaron 15 casos identificados entre los años 2002-2004, de los cuales el 68% mostraron títulos de anticuerpos IgG por medio de IFA contra *R. rickettsii*. En esta región se encontraron solamente garrapatas *R. sanguineus* en las áreas que frecuentaban los pacientes, las cuales estaban asociadas con abundante pasto y perros callejeros. Se obtuvieron muestras de perros de 4 de los pacientes, los cuales el 100% mostraron títulos de anticuerpos IgG por medio de IFA con *R. rickettsii* (Demma et al., 2005).

Durante el 2005 y 2006, se realizó un estudio serológica entre perros callejeros y abandonados llevados al control animal de Arizona, el cual se localiza fuera del área donde se han reportado casos humanos de rickettsiosis. Se detectaron anticuerpos utilizando IFA en el 5.7% (14 de 247) perros. Los refugios animales localizados en los condados, que incluían o compartían grandes extensiones con el área del brote, eran más probable de tener perros seropositivos que en los controles animales en condados geográficamente separados. También los perros callejeros tenían más probabilidad de ser seropositivos que los animales abandonados, esto indica que se debe controlar las poblaciones de perros callejeros como una acción para limitar la transmisión de rickettsiosis en esta región (McQuiston et al, 2009).

Hidalgo et al. (2007) redescubrieron la enfermedad de FMMR en una localidad en Villeta, Colombia donde había sido reportada por Patiño en 1937. En base al muestreo de 371 personas y la utilización de la técnica de IFA para detectar anticuerpos IgG contra *R. rickettsii*. Estas muestras fueron analizadas con la titulación más baja de 1:64 y un aumento doble en las diluciones que llego a la titulación final de 1:2,048. Los resultados obtenidos fueron que 40.3% personas tenían anticuerpos IgG contra *R. rickettsii*, de ellos 14.6% tuvieron una titulación final de 1:64, 18.4% de 1:128, 5.9% de 1:256 y 1.1% de 1:512. El título máximo observado fue de 1:1,024.

En un estudio realizado en humanos y animales domésticos en Sao Paulo, Brasil, para determinar la prevalencia de anticuerpos a la enfermedad del grupo de las fiebres manchadas, se utilizó la detección de anticuerpos IgG contra *R. rickettsii*. La dilución inicial fue de 1:64. La técnica de IFA detectó anticuerpos de un total de 76 muestras, en el 77% de los caballos, en el 31% de perros y no se detectó en asnos y humanos. Cuando los sueros reactivos a *R. rickettsii* fueron probados contra cuatro antígenos *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. africae*, *R. akari* y *R. bellii*); 5 sueros caballos y 1 suero de perro mostraron títulos a *R. rickettsii* en un incremento de al menos cuatro diluciones de cualquier otros tres antígenos restantes (Horta et al., 2004).

En un estudio realizado en Oklahoma, EUA, se analizaron sueros de 259 perros para la determinación serológica de anticuerpos IgG contra *R. rickettsii*. El 38% de la población canina tuvo anticuerpos  $\geq 64$ , siendo el 6% los que obtuvieron títulos altos de  $\geq 1,024$  (Rodgers et al., 1989).

**Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):** Esta técnica es útil para el diagnóstico de *Rickettsia* sp y es utilizado en estudios epidemiológicos (Kováčová et al., 2000). Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción (Anaya et al., 2007).

El procedimiento utilizado por el paquete *Rickettsia rickettsii* ELISA<sup>®</sup> Helica Biosystems, Inc., para la detección de anticuerpos caninos de IgG contra *R. rickettsii* es el siguiente. El suero del paciente es diluido 1:100 y se deja a que éste reaccione con los antígenos revestidos de *R. rickettsii* que se encuentran en unos pocitos especiales. Después de una incubación, los pozos se lavan para remover las proteínas séricas no tratadas y se le agrega una enzima marcada anti-IgG de perro (conjugado) para que reaccionen con los complejos antígeno-anticuerpo. Después de otro período de incubación los pozos son nuevamente lavados para remover el conjugado no reactivo. Se le añade un sustrato de peróxido de urea con TMB ( 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) como cromógeno para empezar el desarrollo del color. El desarrollo de un color azul indica una reacción positiva mientras que una reacción negativa aparece incolora o con una traza de color azul. La reacción es interrumpida con una solución de parada. La intensidad del color (absorbancia) es leída a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro o en un lector de ELISA. También se puede realizar una determinación visual con la ayuda de la tabla que se proporciona en el inserto. La Interpretación de resultados es la evaluación del color de la reacción final comparándola con el control positivo y



negativo o se puede leer en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm. El color final debe virar de azul a amarillo. Tiempo aproximado de la técnica es de 60 minutos.

La técnica de ELISA se está utilizando con mayor frecuencia y su precisión depende de la calidad y especificidad del antígeno y los niveles mínimos de los títulos considerados como positivos (McDade 1991, Chapman et al., 2006).

Romano et al, (1998) muestrearon 30 perros del Centro Antirrábico de Mexicali durante los meses de septiembre a diciembre de 1997. Los resultados obtenidos fueron que el 16.6% tuvieron títulos positivos a *R. rickettsii*.

En Perú se realizó un trabajo donde sus objetivos fueron implementar una prueba casera de ELISA IgM para rickettsiosis y compararla con prueba de IFA IgM casera, demostrar la detección temprana de anticuerpos IgM en pacientes agudos y contribuir con el diagnóstico diferencial de etiologías con cuadro febril indiferenciado. Se utilizaron 55 sueros negativos y 100 sueros positivos. Se utilizó como antígeno un lisado total de una cepa de referencia de *R. akarii* cepa Kaplan. Esta prueba de ELISA indirecta IgM mostró una sensibilidad del 78% y una especificidad del 80%. La técnica de IFA IgM mostró una sensibilidad del 82% y una especificidad del 90.9% (Anaya et al., 2007).

## ***Métodos moleculares***

Para el diagnóstico con métodos moleculares se puede utilizar sangre, biopsias de piel, tejido y garrapatas. Como anticoagulante se utiliza el citrato o EDTA. La heparina como anticoagulante no es recomendada debido a que interfiere con la técnica al inhibir la Taq polimerasa durante el PCR (Yokota et al., 1999).

La amplificación de ADN específico por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido el diagnóstico rápido, tanto para la detección e identificación de *Rickettsia* spp en sangre, biopsias de piel y en garrapatas. La sensibilidad y especificidad varía entre las técnicas utilizadas (Fenollar et al. 2004). El mínimo número de microorganismos que deben de estar presentes para resultar positivos es de 50 copias de ADN riquetsial por milímetro (Leitner et al 2002).

### ***Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

**convencional:** La técnica se basa en la replicación del ADN realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' - 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se utilizan los iniciadores (Cuadro 1), los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar (McKee et al., 2003).

Partiendo de este principio, la reacción en cadena de la polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: a) Desnaturalización del ADN de doble cadena, b) Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras y c) Extensión del iniciador por actuación de la ADN polimerasa (McKee et al., 2003).

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la identificación de genes riquetsiales

Iniciadores	Gen	Especie	Muestra requerida
<b>Citrato Sintasa (gltA).</b>	Citrato Sintasa del ciclo de Krebs	Todas especies.	Piel
<b>ompA</b>	Proteínas externas de membrana A	Todas especies. Excepción: <i>R. helvética, R. australis, R. bellii, R. canadensis</i>	Piel y Suero
<b>ompB</b>	Proteínas externas de membrana B	Todas las especies. Excepción: <i>R. helvética, R. bellii, R. massiliae</i>	Piel
<b>Gen codificador de proteína 17-kDa (Tz) (htrA)</b>	Lipoproteína de membrana externa	<i>R. rickettsii</i> Todas las especies	Piel, Suero, Sangre y Garrapatas
<b>Gen D</b>	Proteínas externas de membrana	Mayoría <i>Rickettsia</i> sp	Piel

(Brouqui et al, 2004, Parola et al., 2005).

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya. En el segundo paso (hibridación) los iniciadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la disminución de la temperatura (50-65°C). En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (por la complementariedad) en la dirección 5' - 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Tzianabos et al., 1989).

La sensibilidad puede estar afectada por varios factores incluyendo la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa, degradación de la muestra, sitio de muestreo en piel, el tratamiento antibacteriano previo al muestreo así como la contaminación de amplicones de ensayos previos con el mismo iniciador y por el ADN entre los 2 pasos de la amplificación (Fenollar et al., 2004). El tiempo aproximado de la técnica es de 350 minutos.

La presencia de bandas fluorescentes observadas en un gel de agarosa en electroforesis son indicativas de presencia del fragmento del ADN analizado (McKee et al., 2003).

En 1989, se realizó un estudio para la detección de ADN de *R. rickettsii* en muestras clínicas por medio de la técnica de PCR. Se diseñaron dos iniciadores oligonucleótidos para amplificarse Tz-15-19 y Tz-16-20. El Tz-19 es

un oligonucleótido sintético de 19-residuos con una secuencia de 5'-TTCTCAATTCGGTAAGGGC-3'. Tz-16 es un oligonucleótido sintético de 20-residuos con una secuencia de 5'-ATATTGACCAGTGCTATTTC-3'. Estos iniciadores definen un fragmento de 246 pares de bases de la región codificante del gen del antígeno 17-kDa de *R. rickettsii* y fueron seleccionados debido a que contienen una secuencia al final del 3' que son únicos al grupo de las fiebre manchadas. Se utilizaron coágulos de sangre de nueve pacientes confirmados con la enfermedad de FMMR y seis controles fueron analizados. Se pudo amplificar con éxito una región definida del genoma riquetsial de 7 de las 9 muestras, los seis controles fueron negativos. La falta de amplificación en los 2 pacientes pudo deberse a los niveles de *R. rickettsii* en sangre y no por la ausencia de las secuencias del iniciador (Tzianabos et al., 1989).

Del 2003 al 2004 se evaluaron 16 pacientes sospechosos de la FMMR en Arizona, EUA. Se les obtuvieron muestras de sangre o tejido las cuales se les realizó la extracción del ADN para realizar el PCR para amplificar el gen 17-kD (*htrA*) de las *Rickettsia sp* del grupo de la fiebre manchada. Las muestras que salieron positivas se les realizó otro PCR utilizando el gen *ompA* y la identificación de la especie de *R. rickettsii* fue confirmada a través de la secuencia de ADN. Como resultado 11 pacientes fueron confirmados con la enfermedad y 5 de ellos resultaron sospechosos (Demma et al., 2005).

Tinoco et al (2009) muestrearon 21 perros con signología compatible con riquetsiosis en un área de nivel socioeconómico bajo en la ciudad de Mexicali, BC, México, donde se había reportado un brote de riquetsiosis. De los sueros

positivos se tomaron 16 para realizarles PCR con el gen *gltA* de *Rickettsia* sp, donde, 14 resultaron positivos. Posteriormente se mandó secuenciar una muestra de tejido renal de una niña que falleció la cual presentaba signología compatible con rickettsiosis, el cual resultó positivo.

### **Cultivo**

Para la prueba del cultivo se recolecta 5 ml de sangre en tubos con anticoagulante con heparina o citrato; también se puede utilizar tejido, biopsias de piel y garrapatas (La Scola et al., 1997; Brouqui et al., 2004).

El método diagnóstico estándar para las enfermedades infecciosas es el aislamiento e identificación del agente etiológico. El aislamiento se puede realizar en 4 a 7 días. Se cultivan en células Vero, células L ó fibroblastos de embrión de pollo. También se pueden aislar inoculando el saco de yema de huevo de gallina de 5 a 6 días. Las *Rickettsia* sp cultivadas se pueden identificar provisionalmente por medio de la tinción con inmunofluorescencia y el método Gimenez (Walker et al., 1989).

Debido a que el agente causal de la FMMR es un patógeno obligado intracelular, deben de ser aislados utilizando técnicas de cultivo celular que son más laboriosas y requieren de un mayor tiempo para realizarse a diferencia de las pruebas serológicas y de PCR. Ya que *R. rickettsii* es clasificada en Nivel 3 de bioseguridad, el aislamiento de este agente debe realizarse en laboratorios equipados para manejar patógenos de Nivel 3 de bioseguridad; y deben de cumplir con las regulaciones federales (Chapman et al., 2006).

La técnica de cultivo en vial es un sistema de microcultivo que ha demostrado ser eficiente para el aislamiento de las *Rickettsia* sp de diferentes muestras. Se hace por triplicado. Este método requiere una centrifugación la cual es crítica ya que incrementa la proporción de *Rickettsia* sp en las células. Una de las líneas celulares para el aislamiento son las células del pulmón embrionario humano (PEH). La multiplicación de las líneas celulares y la variación de la temperatura del cultivo permiten una variedad en las condiciones del mismo. Las *Rickettsia* sp se pueden detectar en las células por medio de la tinción de Gimenez e inmunofluorescencia. El cultivo se guarda durante 2 semanas donde se examina un cultivo en vial cada semana. Si la tinción resulta negativa el cultivo es negativo. En caso de salir la tinción positiva se realiza PCR y el cultivo en vial, y son inoculados a otra monocapa de células de PEH. Aunque este método es útil, cerca de un tercio del aislamiento es perdido entre cada pasaje por razones desconocidas (Fenollar et al., 2007).



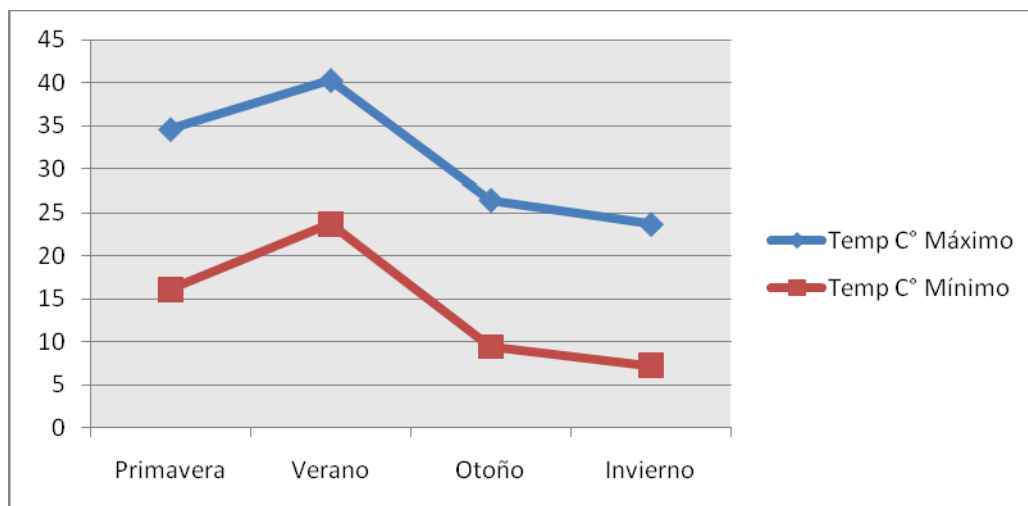
## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando muestras sanguíneas de perros de Mexicali, Baja California, colectadas en 2 períodos. El periodo 1 comprendió desde febrero de 2005 a diciembre de 2006 y el periodo 2 de junio a agosto del 2009.

### Localización

La ciudad de Mexicali está localizada en el noroeste del país a  $32^{\circ} 40'$  norte y  $115^{\circ} 28'$  oeste en el estado de Baja California y cuenta con 936,145 habitantes. Estos datos fueron proporcionados por El Censo de Población y Viviendo 2010 del Instituto de Nacional de Estadística y Geografía. Su clima es extremo y desértico. El comportamiento estacional para las temperaturas máximas y mínimas promedio se presenta en la Figura 1.

Figura 1. Promedio de temperaturas máximas y mínimas por estación del año.



Además, el promedio anual de precipitación pluvial es de  $0.63 \pm .43$  cm. Los datos de las condiciones climatológicas fueron proporcionados por la agencia *National Weather Service* del *National Oceanic and Atmospheric Administration* del Gobierno de los Estados Unidos.

### **Tamaño muestral**

La estimación del tamaño de la muestra se realizó de aplicar la siguiente fórmula, por marco de muestreo, definido como:

Periodo 1: Clínicas veterinarias

Periodo 1: Centro de control animal

Periodo 2: Centro de control animal zona urbana

Periodo 2: Centro de control animal zona rural

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

donde:

n: tamaño de muestra

$\hat{\pi}$ : estimador de varianza máxima 50%

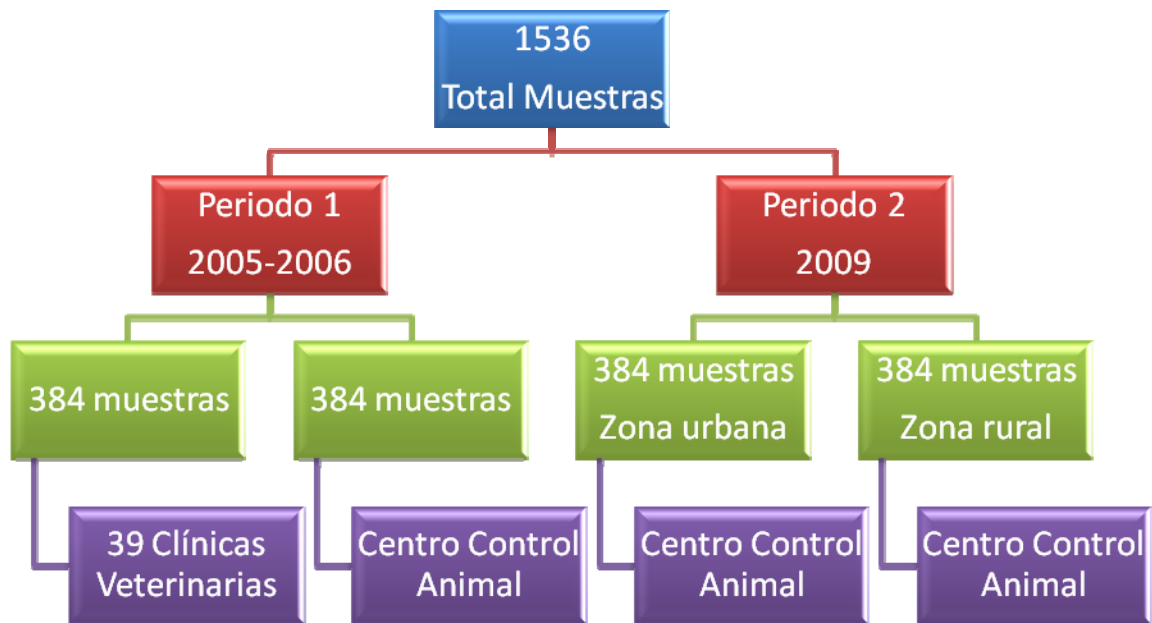
Z= valor de tablas Normal estándar = 1.96

d: precisión 5%

(Scheaffer et al., 1987)

La distribución de las 1,536 muestras sanguíneas de perros se aprecia en el Figura 2.

Figura 2. Distribución de muestras sanguíneas



### **Criterios de inclusión**

Perros de al menos un mes de edad, de cualquier sexo o raza atendidos en cualquiera de las clínicas veterinarias participantes en el estudio, así como los perros capturados por el personal del centro control animal.

### **Criterios de exclusión**

Muestras sanguíneas con un volumen menor a 0.5 ml.

## **Muestreo**


Se obtuvo 3 mL de sangre por punción cefálica, previa asepsia, y se colocaron 1.5 mL en tubos Vacutainer® sin anticoagulante y 1.5 mL en tubos con EDTA. Se identificaron las muestras y fueron centrifugadas en una centrífuga de marca Heraeus, modelo Megafuse 1.0 (Alemania), a 3,500 rpm durante 10 minutos para separar el suero del coágulo. El suero fue transferido a viales de plástico con tapa y fueron almacenados a -20° C hasta el momento de realizar la prueba serológica (Stockham et al., 2007).

## **Análisis serológico**

Los análisis serológicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

El análisis serológico se realizó con el kit *Rickettsia rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., esta técnica consta de la detección y semicuantificación de IgG canino con una sensibilidad del 99.5% y especificidad del 96%, y se realizó conforme las especificaciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas en un lector de ELISA marca BioRad, modelo 3550 (Estados Unidos de Norteamérica), con filtro de 450 nm, las muestras se consideraron positivas cuando la densidad óptica fue  $\geq 0.3$ , de acuerdo al fabricante como se observa en la Figura 3.

Figura 3.- Muestras

Muestras positivas 



seropositivas

### **Seroprevalencia**

La prevalencia fue calculada dividiendo el número de sueros positivos obtenidos entre el total de muestras analizadas. La prevalencia ajustada y el 95% IC (intervalo de confianza) fueron obtenidos utilizando el estimador Rogan-Gladen (Greiner et al., 2000)

### **Pruebas moleculares**

Para confirmar la presencia de la enfermedad se seleccionaron aleatoriamente 40 muestras sanguíneas del total de sueros seropositivos (Cochran 1980) a rickettsiosis del periodo 1 para realizarles PCR de *R. rickettsii* con los siguientes iniciadores específicos:

Tz-15 (5'-TTCTCAATTCGGTAAGGGC-3')

Tz-16 (5'-ATATTGACCAGTGCTATTTC-3')

La banda esperada fue de 246 pares de bases (Tzianabos et al., 1989).

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: Un ciclo a 95°C por 5 min, 45 ciclos a 95°C por 30 s, 55 por 2 min y 72 por 30 s, y finalmente un ciclo a 72°C por 7 min.

Los productos de amplificación por PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE (tris-acetato EDTA 1X) conteniendo el colorante de ácidos nucleicos GR Safe®, en lugar de bromuro de etidio.

Para prevenir que las muestras se contaminaran, la extracción del ADN, las preparaciones de PCR, la amplificación y la detección de productos de PCR fueron realizados en diferentes áreas de laboratorio (Chang et al., 2000).

Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

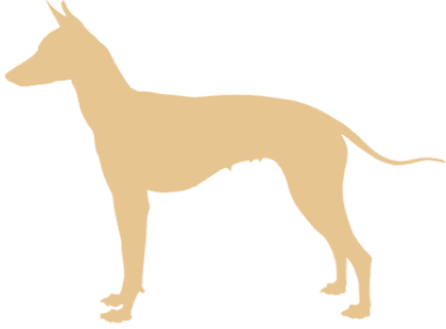
### **Factores asociados**

Para el estudio de factores asociados, se diseñaron dos cuestionarios los cuales fueron aplicados tanto en las clínicas veterinarias (Cuadro 2) como en el centro de control animal (Cuadro 3). En ambos cuestionarios se adicionó una figura para identificar la afinidad de las garrapatas hacia alguna región corporal del perro.

## Cuadro 2. Cuestionario aplicado en clínicas veterinarias

### ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO Y RIQUETSIOSIS


Fecha: (día/mes/año)	
Nombre de la Clínica o Consultorio:	
Nombre del propietario:	
Colonia:	
Teléfono:	
Ocupación:	
Nombre del perro:	
Edad:	( ) <12 meses ( ) >1 año
Sexo:	( ) Macho ( ) Hembra
Talla:	( ) Chico ( ) Mediano ( ) Grande < 7 kgs 7-20 kgs > 20 kgs
Pelaje:	( ) Corto ( ) Mediano ( ) Largo
Raza:	( ) Mestizo ( ) Otro
¿Cuántos perros hay en el hogar?	( ) Perros
¿Cada cuántas veces al año aplica baño garrapaticida a su perro?	
Nombre del garrapaticida:	
¿Cada cuántas veces al año administra medicamento desparasitante contra garrapatas?	
Nombre del desparasitante:	
¿Presenta emaciación?	( ) Si ( ) No
¿Presenta depresión?	( ) Si ( ) No
¿Presenta alguna claudicación su perro?	( ) Si ( ) No
¿En qué miembro(s)?	MAI ( ) MAD ( ) MPI ( ) MPD ( )
¿Ha sangrado por la nariz?	( ) Si ( ) No
¿Ha presentado problemas nerviosos (convulsiones, parálisis, coma)?	( ) Si ( ) No

¿Ha sangrado por la nariz?	( ) Si ( ) No
¿Ha presentado problemas nerviosos (convulsiones, parálisis, coma)?	( ) Si ( ) No
¿El perro vive únicamente dentro de la casa?	( ) Si ( ) No
¿El patio de la casa es totalmente de cemento?	( ) Si ( ) No
¿Entran y/o salen perros de su casa a la calle?	( ) Si ( ) No
¿Cada cuántas veces al año fumiga su casa?	
¿Lo lleva de paseo al campo, fuera de la ciudad?	( ) Si ( ) No
Presencia y grado de infestación de garrapatas:	( ) Ligera ( ) Moderada ( ) Severa 1-10 11-30 > 30 (Tinoco et al 2009)
Afinidad de las garrapatas hacia alguna región corporal: - Cara - Orejas - Cuello - Dorso - Extremidades - Abdomen	



### Cuadro 3. Cuestionario aplicado en el centro de control animal

#### ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO Y RIQUETSIOSIS

Fecha: (día/mes/año)	
Procedencia (colonia de captura)	
Edad:	( ) <12 meses ( ) >1 año
Sexo:	( ) Macho ( ) Hembra
Talla:	( ) Chico ( ) Mediano ( ) Grande < 7 kgs 7-20 kgs > 20 kgs
Pelaje:	( ) Corto ( ) Mediano ( ) Largo
Raza:	( ) Mestizo ( ) Otro
Emaciación:	( ) Si ( ) No
Depresión:	( ) Si ( ) No
Claudicación: ( miembro-s)	MAI ( ) MAD ( ) MPI ( ) MPD ( )
Presencia y grado de infestación de garrapatas:	( ) Ligera ( ) Moderada ( ) Severa 1-10 11-30 > 30 (Tinoco et al 2009)
Afinidad de las garrapatas hacia alguna región corporal:  - Cara - Orejas - Cuello - Dorso - Extremidades - Abdomen	

## **Asociación de factores y seroprevalencia**

Se estimó la magnitud de asociación, entre la seropositividad de los perros a *R. rickettsii* y los factores de riesgo mediante la razón de probabilidades (Odds ratio, OR). El estadístico chi-cuadrada ( $\chi^2$ ) de Mantel-Haenszel, fue utilizado para evaluar la hipótesis de independencia de distribución del factor de estudio y los resultados de ELISA.

### **Análisis estadístico**

Se utilizaron los procedimientos FREQ y LOGISTIC del paquete estadístico SAS 9.2 (Statistical Analysis System). El primero para el análisis de frecuencia en los casos positivos y negativos, en la prueba de independencia del factor de estudio y por la evaluación de la asociación del factor de riesgo con presencia o ausencia de la enfermedad en tablas de contingencia 2X2.

Los valores de OR fueron acompañados de intervalos de confianza al 95%.

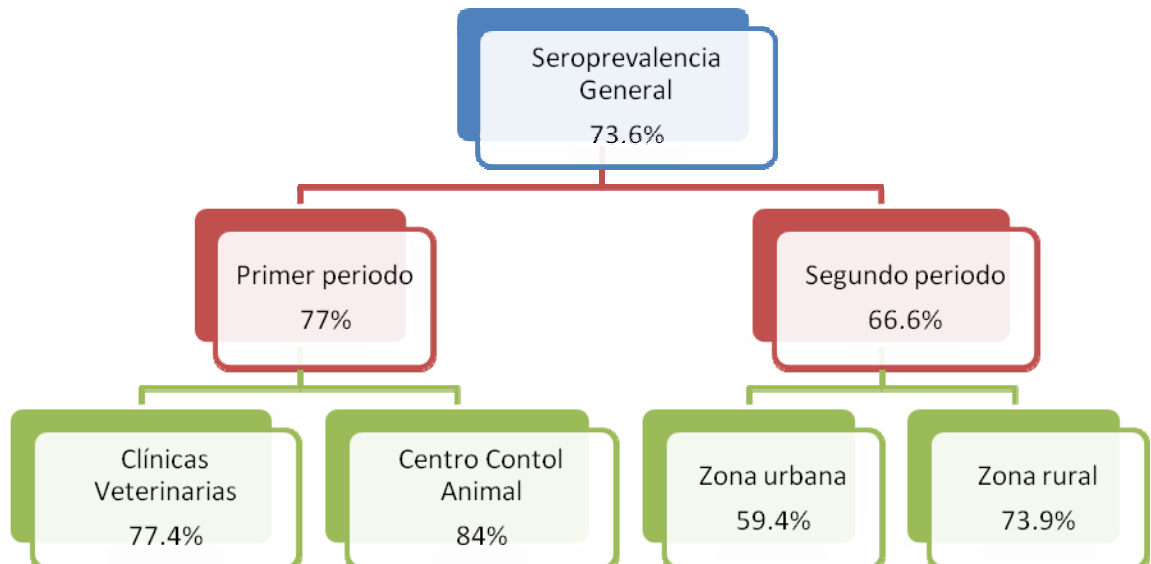
Cada factor de riesgo fue ajustado por variables de confusión al emplear un análisis univariado de regresión logística (PROC LOGISTIC).

## RESULTADOS

### Seroprevalencia

La seroprevalencia general en este trabajo fue de 73.6% (95% IC 67.9-72.6). La distribución de las prevalencias en ambos periodos se muestran en la Figura 4.

Figura 4.- Seroprevalencia general y su distribución



La seroprevalencia de riquetsiosis del periodo 1 fue de 77% (95% IC 73.8-80.1), se observó diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre el porcentaje de seropositividad obtenidas de las clínicas veterinarias y los perros capturados por el centro de control animal (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Seroprevalencia entre clínicas veterinarias y centro control animal.

Procedencia	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	$\chi^2_c$	
<b>Centro Control Animal</b>	384	84%	308	4.2	**
<b>Clínicas veterinarias</b>	384	77.4%	284		

La seroprevalencia de riquetsiosis del Periodo 2 fue de 66.6% (95% IC 60.0-67.1), se observó diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre el porcentaje de seropositividad obtenidas de perros capturados por el centro de control animal de la zona rural y zona urbana (Cuadro 5).

Cuadro 5.- Seroprevalencia entre la zona rural y zona urbana.

Procedencia	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	$\chi^2_c$	
<b>Zona rural</b>	384	73.9%	271	15.7	**
<b>Zona urbana</b>	384	59.4%	218		

Los valores de seroprevalencia entres periodos fueron diferentes ( $P < 0.05$ ). Cuadro 6.

Cuadro 6.- Seroprevalencia entre el periodo 1 y periodo 2.

Procedencia	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	$\chi^2_c$	
<b>Periodo 1</b>	768	77 %	591	32.4	**
<b>Periodo 2</b>	768	66.6 %	489		

Los resultados obtenidos de los dos periodos junto con los factores asociados a la enfermedad se muestran a continuación.

### **Periodo 1 (2005-2006)**

#### **Clínicas Veterinarias de la zona urbana**

La seroprevalencia de riquetsiosis fue 77.4% (95% IC 69.3-78.5). De los factores evaluados, en el cuadro 7 se muestran solamente aquellos con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 7.- Factores de riesgo asociados a *R. rickettsii* en clínicas veterinarias periodo 1.

Factor Riesgo	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	OR	IC 95%
<b>Edad</b>					
> 1 año	277	85.5 %	237	7.5	4.5 - 12.5
< 1 año	107	43.9 %	47		
<b>Talla</b>					
Mediana- grande	297	76.7 %	228	1.8	1.0 - 3.0
Chica	87	64.3 %	56		
<b>Desplazamiento del perro a la calle</b>					
Si	112	81.2 %	91	1.7	1.0 - 3.0
No	272	70.9 %	193		
<b>Cumplir con el programa medicina preventiva</b>					
No	234	77.3 %	181	2.3	1.3 - 3.9
Si	150	68.6 %	103		

### Centro de Control Animal

La seroprevalencia de rickettsiosis fue de 84% (95%, IC 64.6-74.3). De los factores evaluados, en el cuadro 8 se muestran solamente aquellos con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 8.- Factores de riesgo asociados a *R. rickettsii* en perros capturados por el centro control animal periodo 1.

Factor Riesgo	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	OR	IC 95%
<b>Edad</b>					
> 1 año	314	86.3 %	271	5.6	3.1 – 9.9
< 1 año	70	52.8 %	37		
<b>Talla</b>					
Mediana-grande	318	82.7 %	263	2.2	1.2 - 4.0
Chica	66	68.1 %	45		
<b>Sexo</b>					
Machos	172	86.6 %	149	2.1	1.2 - 3.6
Hembras	212	75.0 %	159		

## Periodo 2 (2009)

### Zona rural

La seroprevalencia de rickettsiosis por *R. rickettsii* fue 73.9% (IC 95% 65.8-75.3%). De los factores evaluados, en el cuadro 9 se muestran solamente aquellos con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 9.- Factores de riesgo asociados a *R. rickettsii* en perros zona rural periodo 2.

Factor Riesgo	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	OR	IC 95%
<b>Edad</b>					
> 1 año	342	75.1 %	257	6.0	3.0 – 12.0
< 1 año	42	33.3 %	14		
<b>Talla</b>					
Mediana-grande	265	79.6 %	211	3.8	2.4 – 6.1
Chica	199	50.4 %	60		
<b>Sexo</b>					
Machos	241	74.2%	179	1.6	1.0 – 2.5
Hembras	143	64.3 %	92		

### Zona urbana

La seroprevalencia de rickettsiosis por *R. rickettsii* fue de 59.4% (95% IC 51.5-61.9). De los factores evaluados, en el cuadro 10 se muestran solamente aquellos con diferencia estadística ( $P < 0.05$ ).



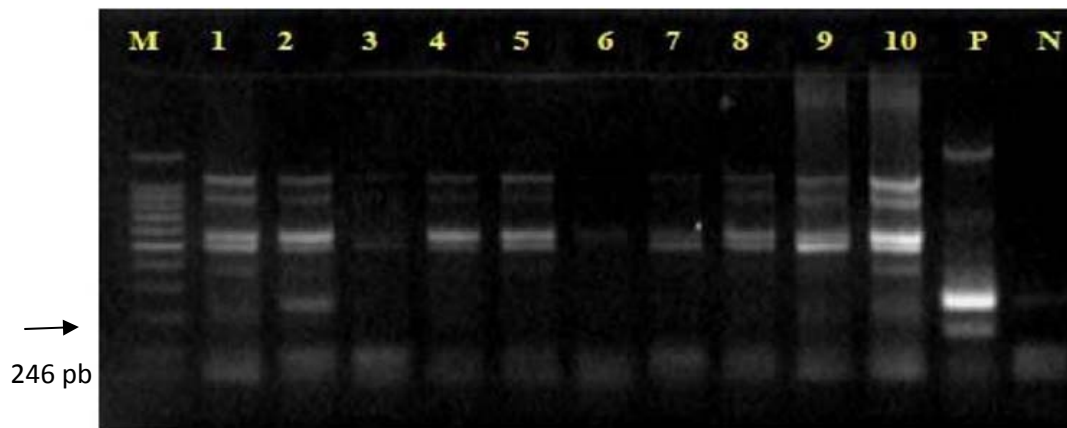
Cuadro 10.- Factores de riesgo asociados a *R. rickettsii* en perros de la zona urbana periodo 2.

Factor Riesgo	Total perros	Porcentaje	Perros positivos	OR	IC 95%
<b>Edad</b>					
> 1 año	327	64.2 %	210	10.9	5.0 - 24.0
< 1 año	8	14.0 %	57		
<b>Talla</b>					
Mediana-grande	298	62.4 %	186	2.8	1.7 - 4.6
Chica	86	37.2 %	32		

### Diagnóstico molecular

De las 40 muestras sanguíneas tomadas al azar de entre perros seropositivos a rickettsiosis del 2009, 8 resultaron positivos a PCR de *R. rickettsii*, mostrando en el gel de electroforesis la banda de 246 pares de bases, específica del agente etiológico. Figura 5

Figura 5.- PCR de 17-kDa de *R. rickettsii* en sangre de perros seropositivos



**M:** Marcador

**1-10:** Muestras perros

**P:** Control positivo

**N:** Control negativo

**+** : Muestra positiva

**-** : Muestra negativa

## DISCUSIÓN

### Seroprevalencia

La prevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsia ha sido evaluada en el continente americano, como lo señalan Rodgers et al (1989), Comer et al (2001), Gasser et al (2001), Demma et al (2004), Horta et al (2004), Demma et al (2005), Hidalgo et al. (2007), Saito et al (2008) y McQuiston et al (2009), empleando IFA como prueba diagnóstica y teniendo a diversos vectores como transmisores de la enfermedad a excepción de Demma et al (2004) quien reportó al mismo vector que en este estudio. En este trabajo se utilizó ELISA como prueba diagnóstica debido a su costo, buena sensibilidad, reproducibilidad, sencilla de realizar y obtención rápida de resultados. En los últimos 12 años, no existen trabajos publicados, donde esta enfermedad haya sido evaluada en áreas donde el vector de la enfermedad es *R. sanguineus* y hayan utilizado para el diagnóstico la prueba de ELISA, por lo tanto los resultados de este trabajo no se pueden comparar directamente con los generados en otros estudios. La IFA es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de rickettsiosis debido a su elevada sensibilidad, medición cuantitativa de los anticuerpos y a la identificación del agente etiológico. Es importante señalar que en el área donde se realizó el trabajo, estudios anteriores han detectado prevalencias altas (>80%) por ELISA por lo que se esperaría que el valor predictivo positivo al aplicar únicamente la prueba de ELISA como prueba de diagnóstico fuera alto (>85%) (Martin *et al.*,1997), es

decir una alta proporción de los animales declarados como seropositivos por esta prueba tendrían que serlo. En cuanto al valor de prevalencia encontrado en este trabajo del 73.6% (IC 95% 67.9-72.6) en la ciudad de Mexicali BC, México fue mayor a los reportes de Demma et al (2004) quienes observaron una prevalencia del 70% y 57% en Arizona, EEUU utilizando perros que fueron llevados a las clínicas para ser vacunados contra la rabia. En esta zona el vector principal de la zona fue *R. sanguineus*, al igual que lo señala Tinoco et al (2009), en Mexicali, B.C., México con valores de seropositividad del 85%. A diferencia de la seroprevalencia encontrada en Brasil por Saito et al (2008), que fue del 35.2%. Este valor menor se pudo deberse al vector encontrado en esa zona el cual es *A. cajennense*, que tiene como hospedador principal al caballo (Sangioni et al, 2005).

Los valores de seropositividad entre periodos fueron distintos ( $P < 0.05$ ), el mayor valor se observó en el periodo 1 posiblemente debido al efecto largo del periodo de muestreo o a la presencia de una mayor población del vector en la zona.

Al analizar los valores dentro del periodo 1 se observó que los perros capturados por el centro de control animal mostraron valores superiores y distintos ( $P < 0.05$ ) a los perros llevados a las clínicas veterinarias (84 y 77.4% respectivamente), posiblemente a que hubo una mayor seropositividad en machos.

Al comparar los valores dentro del periodo 2 se observó que los perros capturados por el centro de control animal de la zona rural mostró valores superiores y distintos ( $P < 0.05$ ) a los perros capturados por el centro de control animal de la zona urbana (73.9 y 59.4% respectivamente), posiblemente al aumento en la seropositividad de machos o al aumento en la presencia de perros de la comunidad como lo señalan Flores et al (2004). Se encontraron resultados similares por Zavala et al (2009) y por Dantas et al (2009) donde señalan que en las áreas rurales existe mayor riesgo de presentar la enfermedad.

### **Factores de riesgo**

En este estudio los factores de riesgo que mostraron asociación con la enfermedad fueron: edad, sexo, talla, desplazamiento a la calle y el no cumplir con un programa preventivo contra las garrapatas.

Independientemente del periodo y de la procedencia, la edad fue un factor que resultó significativamente asociado a riquetsiosis, ya que los perros mayores a 1 año de edad tuvieron de 5.6 a 10.9 más riesgo de contraer la enfermedad que los cachorros. El máximo valor se observa en el periodo 2 en la zona urbana, estos resultados son similares a los obtenidos en EEUU por Gasser et al (2001), donde se observó que el 93% de los perros seropositivos eran mayores a 1 año de edad y por Comer et al (2001) donde el 17% eran mayores a un año el autor sugiere que el aumento en la seropositividad en

perros adultos puede deberse a una exposición prolongada al vector o a la persistencia de los anticuerpos en el perro durante un mayor periodo de tiempo.

En ambos periodos se observó que los machos tuvieron mayor riesgo que las hembras a presentar la enfermedad, los valores observados fueron muy homogéneos ya que los oscilaron entre 1.6 a 2.1, esto puede deberse a la conducta de vagabundeo la cual se manifiesta más frecuentemente en el macho (Manteca 2003). Flores et al (2001), realizaron un estudio en Mexicali, BC, México, donde se observó que las personas tenían predilección 1.5 más por los machos que por las hembras. También podría deberse a la movilidad de los machos en épocas de apareamiento donde tienden ir en busca de hembras receptivas.

Los perros de talla mediana a grande tuvieron mayor riesgo que los de talla chica, este hallazgo se observó en ambos periodos, donde los valores oscilaron del 1.8 al 3.8. En este estudio la talla se definió por el peso corporal de los perros. En estudios realizados donde se observó asociación con el tamaño del perro, se reportó una alta asociación ( $P < 0.05$ ) en perros utilizados para la caza y el pastoreo en el sur de Brasil, donde el vector principal es *Amblyomma cajennense*, (Saito et al, 2008), a diferencia de los estudios realizados por Rodgers et (1989) donde no encontraron diferencia estadística en el tamaño del perro. En este estudio podría deberse a la predilección de las personas a tener un perro de talla mediana-grande como guardianes de su hogar, otro factor podría ser la facilidad de capturar un perro de talla mediana-

grande es mayor a uno de talla chica, ya que éstos se pueden esconder fácilmente o meterse a casas por entre las rejas.

Los perros que se desplazan a la calle mostraron 1.7 mayor riesgo de presentar la enfermedad a diferencia de aquellos que permanecen dentro del hogar, Comer et al (2001) en su estudio no observaron asociación entre la seropositividad y el desplazamiento del perro a la calle, esto podría deberse a que el hospedador en este estudio es el ratón casero y el vector el ácaro del ratón, lo que nos indica que esta ácaro tiene poca predilección por el perro. Sin embargo Flores et al (2001) reportaron que el 32% de las familias mexicalenses permitían la salida de sus perros de las casas. Sugiriendo la falta de responsabilidad de los propietarios de mantener a su mascota dentro del perímetro de su hogar.

El no cumplir con un programa preventivo contra las garrapatas tiene 2.3 mayor riesgo de presentar la enfermedad que en aquellos donde los propietarios se responsabilizan de desparasitar y bañar a su mascota, como también, el de fumigar su casa para evitar la presencia de insectos y artrópodos. Comer et al (2001) observaron un aumento en la seropositividad para riquetsiosis en aquellos perros que los propietarios no utilizaban repelentes contra garrapatas (12%) que en aquellos que si la utilizaban (5%), sin embargo la diferencia no fue significativa. Esto se puede deber a que los productos comercialmente utilizados para la eliminación de las garrapatas no son los mismos para la eliminación de los ácaros.

## **Diagnóstico molecular**

De las 40 muestras tomadas al azar de sueros positivos en este estudio, sólo 8 resultaron positivas a PCR a diferencia de lo obtenido por Tinoco et al (en prensa 2009) donde realizó PCR con los iniciadores Tz15 y Tz16 específicos para *R. rickettsii* a 14 de 16 muestras positivas previamente con el gen *gltA* donde el 100% de ellas resultaron positivas. Esto podría deberse a que los perros no se encontraban en la etapa aguda de la enfermedad como lo señala Graves S. (2004) y Leitner et al (2002). Otro factor importante a considerar es que las pruebas serológicas pueden predecir la presencia o ausencia de enfermedad o del agente de enfermedad, sin embargo, no indican la presencia de la bacteria sino más bien la reacción del organismo a los microorganismos, por lo que pueden dar lugar a resultados falsos-positivos (Martin et al 1997) ya que los títulos IgG pueden persistir hasta un año en el paciente (Clements et al 1983).



## CONCLUSIONES

Los hallazgos serológicos observados en este estudio, demuestran que el municipio de Mexicali es una región altamente endémica para la riquetsiosis y que el vector se encuentra distribuido homogéneamente por toda la ciudad.

El mayor valor de seropositividad se observó en el periodo 1 (77%) y dentro del mismo se observó mayor seropositividad en perros capturados por el centro de control animal (84%).

En el periodo 2 la mayor seropositividad se observó en los perros capturados por el centro de control animal de la zona rural (73.9%).

Los factores de riesgo con mayor asociación a la seropositividad son:

- a) Perros mayores a 1 año de edad
- b) Perros tamaño mediano-grande
- c) Perros machos
- d) Perros que tienen la facilidad de desplazarse a la calle
- e) El no cumplir con un programa preventivo contra las garrapatas

## RECOMENDACIONES

Promover campañas masivas donde se enfatice la necesidad de monitorear regularmente a los perros en búsqueda de garrapatas como también la forma adecuada de retirarlas.

Se recomienda la castración en las mascotas, ya que ésta es útil para disminuir la reproducción indiscriminada y la conducta de vagabundeo.

Promover el papel importante que juega la medicina preventiva en el control de la enfermedad. Para ayudar a controlar al vector, se debe de romper con el ciclo del mismo, ya que pueden tardar hasta 3 años en completar su desarrollo, por lo que, con al menos 3 fumigaciones al año, 3 desparasitaciones y 3 baños garrapaticidas se puede controlar significativamente a la garrapata. Dentro del hogar es necesario sellar grietas, mantener el pasto lo más corto posible, no permitir la entrada a perros callejeros, ni la salida de las mascotas a la calle y mantener limpio el patio y el perímetro del hogar.

Es importante seguir realizando estudios sobre la riquetsiosis para identificar si existen otras especies de riquetsias en el área. Realizar estudios de vigilancia utilizando pruebas serológicas para la detección oportuna de la enfermedad evitando así brotes epidémicos. Dentro de las medidas de prevención y control se debe de reducir la población del vector y del hospedador.

## LITERATURA CITADA

- Anaya, E., C. Morón, P. Arias, J. Chauca and R. Román. 2007. Serodiagnóstico de Rickettsiosis por Prueba ELISA e Inmunofluorescencia IFI IgM. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Centro de Información y Documentación Científica.
- Brouqui P., F. Baellar, G. Baranton, R.J. Birtles, A. Bjoërsdoff, J.R. Blaco, G. Caruso, M. Cinco, P.E. Fournier, E. Francavilla, M. Jensenius, J. Kazar, H. Laferl, A. Lakos, S. Lotric Furlan, M. Maurin, J.A. Oteo, P. Parola, C. Persz-Eid, O. Peter, D. Postic, D. Raoult, A. Tellez, Y, Tselentis and B. Wilske. 2004. Guidelines for the Diagnosis of Tick-Borne Bacterial Diseases in Europe. Clin, Microbiol. Infect. 10:1108-1132.
- Chang, Y.F., Novosol, V., McDonough, S.P., Chang, C.F., Jacobson, R.H., Divers, T., Quimby, F.W., Shin, S., Lein, D.H., 2000, Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. Vet Pathol 37, 68-76.
- Chapman, A. 2006. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichiosis and Anaplasmosis-United States. MMWR. 55:1-28.
- Clements, M L., Dumler J.S., Fiset P., Wisseman C.L., Snyder M.J., Levine M.M. 1983. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. J Infect Dis 148(5):876-880.
- Cochran W.G. 1980. Técnicas de Muestreo. Compañía Editorial Continental. México
- Comer JA., Vargas MC., Poshni I. and Childs J. 2001. Serologic evidence of *Rickettsia akari* infection among dogs in a metropolitan city. JAVMA, 218(11):1780-1782.
- Dantas T.F., Figueredo L.A., Brandão F.S.P. 2009. Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 18:75-77

- Demma, L., M. Traegar, W. Nicholson, C. Paddock, D. Blau, M. Ereemeeva, G. Dasch, M. Levin, J. Singleton, S. Zaki, J. Cheek, D. Swerdlow and J. McQuiston. 2005. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected Tick Vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.* 353:587-594.
- Demma, L., M. Traegar, D. Blau, Gordon R., Johson B., Dickson J., Ethelbah R., Piontkowski S., Levy C., Nicholson WL., Duncan C., Heath K., Cheek J, Swerdlow DL. And McQuiston J. 2006. Serologic Evidence for Exposure to *Rickettsi rickettsii* in Eastern Arizona and Recent Emergence of Rocky Mountain Spotted Fever in This Region. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 6(4):423-429.
- Fenollar, F and D. Raoult. 2004. Molecular Genetic Methods for the Diagnosis of Fastidious Microorganisms. *APMIS.* 112:785-807.
- Fenollar, F., P.E. Fournier, and D. Raoult. 2007. Diagnostic Strategy of Rickettsioses and Ehrlichiosis. En *Rickettsial Diseases.* Raoult, D., and P. Parola. Informa Healthcare. U.S.A. p. 315-330.
- Flores, M. and Estrella G. 2004. Canine ecology and socioeconomic factors associated with dogs unvaccinated against rabies in a Mexican city across the US-Mexico border. *Preventive Veterinary Medicine.* 62:79-87.
- Gasser AM., Birkenheuer AJ, an Breitschwerdt EB. 2001. Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 37(1):41-48
- Gervasoni S.H., A.A. Guglielmone, H.D. Tarabla. 2003. Factores asociados con la parasitación de humanos con garrapatas en las ciudades de Santa Fe y Esperanza. 10 Simposium Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria. Viña del Mar, Chile.
- Graves, S. 2004. Rickettsial Diseases: An Australian Perspective. *Annals of the ACTM,* 5:2, 17-21.
- Greene C.E. and E.B. Breitschwerdt. 1998. Rocky Mountain Spotted Fever; Q Fever and Typhus. En *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* Greene, C.E. Ed. W.B. Saunders Company, U.S.A. p.155-165.
- Greiner M, I.A.Gardner. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med;*45:43-59.

- Heinzen R.A., Hayes S.F., Peacock M.G. and Hackstadt T. 1993. Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. *Infect Immun* 61(5): 1926-1935.
- Hidalgo, M., R. Sanchez, L. Orejuela, J. Hernandez, D.H. Walker and G. Valbuena. 2007. Prevalence of Antibodies Against Spotted Fever Group *Rickettsiae* in a Rural Area of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77:378-380.
- Horta, M.C., M.B. Labruna, L.A. Sangioni, M.C.B. Vianna, S.M. Gennari, M.A.M. Galvão, C.L. Mafra, O. Vidotto, T.T.S. Schumaker and D.H. Walker. 2004. Prevalence of Antibodies to Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Humans and Domestic Animals in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil: Serologic Evidence for Infection by *Rickettsia rickettsii* and Another Spotted Fever Group *Rickettsia*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:93-97.
- Karpathy, S.A., G.A. Dash, and M. Eremeeva. 2007. Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* by use of DNA sequencing of variable intergenic regions. *J Clin Microb.* 45:2545-2553.
- Kováčová E. and J. Kazár. 2000. Rickettsial Diseases and their Serological diagnosis. *Clin. Lab.* 46:239-245.
- LaScola B. and D. Raoult. 1997. Laboratory Diagnosis of Rickettsioses: Current Approaches to Diagnosis of Old and New Rickettsial Diseases. *J. Clin. Microbiol.* 35:2715-2727.
- Leitner M., Yitzhaki S., Rzotkiewicz S. and Keysary A. 2002. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am J Trop Med Hyg*, 67(2), p 166-169
- Manteca V.X. 2003. Etología Clínica Veterinaria del Perro y del Gato. Ed. Gráfica In-Multimédica S.A. p. 80-81
- Masters, E.J., G.S. Olson, S.J. Weiner and C.D. Paddock. 2003. Rocky Mountain Spotted Fever. A clinician's Dilemma. *Arch. Int. Med.* 163:769-774.
- Martin W.S., Meek A.H. and Willeberg P. 1997. Medida de la Frecuencia de la Enfermedad y de la Producción en Epidemiología veterinaria. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. p. 70-71

- McDade, J.E. 1991. Diagnosis of Rickettsial Diseases: A Perspective. *Eur. J. Epidemiol.* 7:270-275.
- McKee, T. and J.R. McKee. 2003. *Bioquímica. La Base Molecular de la Vida.* McGraw Hill-Interamericana. Madrid. p. 586-590.
- McQuiston J. H., Guerra, M. A., Watts, M. R., Lawaczeck, E., Levy, C., Nicholson, W. L., Adjemian, J. and Swerdlow, D. L. 2009. Evidence of Exposure to Spotted Fever Group Rickettsiae among Arizona Dogs Outside a Previously Documented Outbreak Area. *Zoonoses Public Health* no. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01300.x
- Parola, P., and D. Raoult. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 32:897-928
- Parola, P., C.D. Paddock and D. Raoult. 2005. Tick-borne Rickettsiosis Around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin. Microbiol Reviews.* 18:719-756.
- Philip, R.N., A. Casper, R.A. Ormsbee, M.G. Peacock and W. Burgdorfer. 1976. Microimmunofluorescence Test for the Serological Study of Rocky Mountain Spotted Fever and Typhus. *J. Clin. Microbiol.* 3:51-61.
- Rodgers, S.J., Morton, R.J. and C.A. Baldwin. 1989. A Serological Survey of Ehrlichia canis, Ehrlichia equi, Rickettsia rickettsii and Borrelia burgdorferi in Dogs in Oklahoma. *J. Vet. Diag. Invest.* 1:154-159.
- Romano, M., L. Tinoco and F. Covarrubias. 1998. Demostración de Ehrlichia canis mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, Baja California. Congreso AMMVEPE, Aguascaliente, México. P. 86.
- Saito T.B., Nilton A., Filho C., Pacheco R.R., Ferreira F., Pappen F.G., Farias N.A.R., Larson C.E and Labruna M.B. 2008. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 79(1):102-108.
- Sangioni L.A., Horta M.C., Vianna M.C.B., Gennari S.M., Soares R.M., Galvão M.A.M., Schumaker T.T.S., Ferreira F., Vidotto O., Labruna M.B. 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 11:265-270.
- Scheaffer, RL. 1987. *Elementos de muestreo.* Grupo Editorial Iberoamericana. México.

- Stockham, S.L., M.A. Scott. 2008. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Ed. Wiley-Blackwell, 2<sup>nd</sup> edition. P 5-9.
- Swango, L.J., Bankemper K.W., and L.I. Kong. 1989. Bacterial, Rickettsial, Protozoal and Miscellaneous Infections. En Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ettinger, S.J. W.B. Saunders Company, U.S.A. p. 265-281.
- Tinoco, L., O. S. Hori, , G.E., Medina, T.B. Rentería, A. Barreras, A. Tamayo, G. López, V. A. De La Mora, S. A. Cueto, M. Romano, B. J. García. 2009. Diagnóstico serológico y molecular de un brote de rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en perros y un humano en la ciudad de Mexicali, B.C. XXXIV Congreso Anual de Infectología y Microbiología Clínica.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz, et al. (2009). "Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border." Vet Rec. 164(2): 59-61.
- Tzianabos, T., B. Anderson and J. McDade. 1989. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in Clinical Specimens by Using Polymerase Chain Reaction Technology. J. Clin. Microbiol. 27:2866-2868.
- Walker, D.H. 1989. Rocky Mountain Spotted Fever: a Disease in Need of Microbiological Concern, Clin. Microbiol. Rev. 2:227-240.
- Yokota, M., N. Tatsumi, O. Nathalang, T. Yamada and T. Tsuda. 1999. Effects of Heparin on Polymerase Chain Reaction for Blood White Cells. J. Clin. Lab. Analysis. 13:133-140.
- Yu, X.J. and D.H. Walker. 2005. Order II Rickettsiales. En Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Volumen Two. The Proteobacteria. Brenner, D.J., N.R. Krieg and J.T. Staley. Springer. P 96-112.
- Zane, H.D. 2001. Immunology. Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine. W.B. Saunders Company. p. 102-118, 280, 314-320.
- Zavala, J.E., J. Ruiz, I. Vado, A. Billings and D.H. Walker. 1999. Serologic Study of the Prevalence of Rickettsiosis in Yucatan: Evidence for a Prevalent Spotted Fever Group Rickettsiosis. Am. J. Trop. Hyg. 6:405-408.