

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**“DETECCIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Rickettsia* POR PCR EN
PACIENTES DEL SECTOR SALUD Y ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO
EN MEXICALI, BAJA CALIFORNIA”**

TESIS

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

PRESENTA:

PAOLA JAZMIN GÓMEZ CASTELLANOS

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO 23 DE ENERO DE 2015.

HOJA DE CONTROL

Detección de Especies del Género *Rickettsia* por PCR en Pacientes del Sector Salud y Análisis de Factores de Riesgo en Mexicali, Baja California.

Como requisito parcial para obtener el grado de: Maestro en Ciencias Veterinarias.

Dr. Luis Tinoco Gracia

Dr. Gilberto López Valencia

Dr. Gerardo Medina Basulto

Dra. Sawako Oshima

Mexicali, Baja California, México 23 de Enero de 2015.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Moisés Rodríguez Lomelí por apoyar esta investigación brindándonos su tiempo, material y sabiduría con una actitud siempre amable y de interés genuino por este trabajo.

Al Sector Salud de Mexicali por brindarnos las muestras para realizar esta investigación.

Al doctor Gilberto López Valencia por el apoyo brindado para los análisis epidemiológicos y la planeación del estudio.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Julio C. Álvarez Rosas quien fue mi apoyo incondicional durante esta investigación.

A mi hija Romina P. Gómez Gómez quien es mi motor para ser una mejor profesionista y persona.

A mis padres Martha Castellanos y Héctor G. Gómez.

A mis estimados maestros Luis Tinoco Gracia, Gilberto López Valencia, Gerardo Medina Basulto y Sawako Oshima quienes me guiaron con sabiduría, paciencia y amabilidad para realizar un trabajo de calidad.

Y finalmente a todos los alumnos que apoyaron con el procesamiento de muestras para esta investigación.

RESUMEN

Detección de especies del género rickettsia por PCR en pacientes del sector salud y análisis de factores de riesgo en Mexicali, Baja California.

La rickettsiosis es una enfermedad zoonótica ocasionada por bacterias gram negativas intracelulares obligadas del género *Rickettsia* siendo *R. rickettsii* el más importante en el hemisferio oeste. En Mexicali ocurrió un brote de esta enfermedad en humanos en el año 2008 el cual continúa como un problema de salud pública. En este trabajo se analizaron 120 muestras de sangre humana con signos compatibles a la enfermedad proporcionadas por ISESALUD Mexicali obteniendo un 25% (30/120) de positividad a rickettsiosis.

Las muestras positivas fueron sometidas a PCR con el gen *ompA* obteniendo un total de 19 positivos (63.3%) al grupo de las fiebres manchadas. Se enviaron a secuenciar 14 muestras tanto para el gen *ompA* como para el gen *gltA* obteniendo 8 secuencias similares a *R. rickettsii*.

Además se realizó un análisis epidemiológico de factores de riesgo aplicándose un cuestionario a la totalidad de la población de estudio en el cual se pudieron visualizar algunas de las variables asociadas a la historia natural de la enfermedad que están contribuyendo al mantenimiento de la misma en la ciudad.

Se sugieren futuros estudios en tejido humano, además del uso de otras técnicas diagnósticas como el cultivo bacteriano.

Palabras Clave: *Rickettsia*, Epidemiología, PCR, Factores de riesgo,

ompA, *gltA*, secuenciación, Odds ratio.

ABSTRACT

Detection of species from the gender *Rickettsia* by PCR on patients from the Health Department and their risk factors in Mexicali, Baja California.

Rickettsial disease is a zoonotic infection occasioned by gram negative bacteria which live intracellularly on their host and *R. rickettsii* is the most important on the western hemisphere. In Mexicali on the year 2008 an outbreak of this disease occurred in humans and it continues to be a public health problem to the date.

On this study we analyzed 120 human blood samples with compatible signs of the disease, this samples were given to us by ISESALUD Mexicali obtaining a 25% of positivity to *Rickettsia spp.*

The samples that resulted positive were analyzed by PCR with the *ompA* gene and 19 where positive (63.33%) to the spotted fever group.

We sent 14 samples for sequencing using the genes *ompA* and *gltA* and obtained 8 sequences which were similar to *R. rickettsii*.

In addition we made an epidemiologic analysis of risk factors by a survey that was applied to the whole population of study, thus we could notice the variables that were associated with the natural history of the disease in our city.

It is suggested further studies where the sample is human tissue, in addition to other diagnostic techniques like cultivation.

Key Words: *Rickettsia*, Epidemiology, PCR, Risk Factors, *ompA*, *gltA*, sequencing, Odds ratio.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	li
RESUMEN	iii
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Descripción de la enfermedad	3
Clasificación del género <i>Rickettsia</i>	3
Patogénesis	4
Síntomas	6
Vectores artrópodos	7
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9
<i>R. sanguineus en Mexicali</i>	10
Distribución de los agentes riquetsiales	11
Epidemiología	12
Antecedentes	12
Situación en Mexicali	13
Factores de riesgo	14
Sexo	14
Edad	14
Tratamiento	15
Contacto con Animales	16
Diagnóstico	16
Tinción	16
IFI	16
Reacción en cadena de la polimerasa	18
PCR en sangre	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Lugar de estudio	20
Consideraciones éticas y criterios de inclusión	21
Metodología	22
Toma de muestra	22
Diagnóstico de <i>Rickettsia</i> spp. mediante PCR	22
Electroforesis	23
Factores de riesgo	25
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Análisis molecular	26
Análisis de factores de riesgo	29
Sexo	29
Edad	30
DISCUSION	31
Edad	32

Viaje fuera de la ciudad	32
Tratamiento previo	33
Exposición a perros con garrapatas	33
Consulta previa	34
CONCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	37
ANEXOS	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Características patológicas de agentes encontrados por IFI en Mexicali	6
2	Iniciadores utilizados en el estudio	23
3	Resultados de la secuenciación	26
4	Características de la población estudiada	28
5	Magnitud de asociación entre los casos de riquetsiosis y el estrato de sexo de los pacientes	30
6	Desglose de positividad por edades	30
7	Magnitud de asociación entre los casos de riquetsiosis y el estrato de edad de los pacientes	31

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	PCR positivo a <i>Rickettsia spp.</i> con marcador de 50 pares de bases	27
2	Secuencia positiva a <i>R. rickettsii</i> con un 98% de similitud con iniciadores para el gen <i>ompA</i>	27
3	Mes de solicitud de atención por parte del Sector Salud	28

INTRODUCCIÓN

La rickettsiosis es una enfermedad zoonótica ocasionada por bacterias gram negativas intracelulares obligadas del género *Rickettsia*. Es una enfermedad con distribución mundial y las diferentes bacterias que la ocasionan están sub divididas en grupos de acuerdo a sus similitudes. La mayoría de las especies patógenas reconocidas están clasificadas dentro del grupo de las fiebres manchadas, el cual incluye agentes que son transmitidos a los humanos por garrapatas, siendo *R. rickettsii* el patógeno rickettsial mas importante en el hemisferio oeste (Pacheco, Moraes-Filho et al. 2011).

En la ciudad de Mexicali se han detectado mediante la prueba oro (IFA) distintas especies como son *R. rickettsii*, *R. prowazekii* y *R. typhi* en humanos y en perros (www.saludbc.gob.mx, 2014 ; Tinoco et al., 2009). Sin embargo, la inmunofluorescencia posee diferentes reacciones cruzadas entre los grupos de agentes rickettsiales y entre las especies que los componen (Hechemy et al., 1989; La Scola et al., 1997), volviéndose entonces necesaria la aplicación de otras pruebas que corroboren sus resultados como son técnicas de adsorción cruzada o Western blot (La Scola, Rydkina et al. 2000; Jensenius, Fournier et al. 2004). Cuando existen reacciones cruzadas el origen geográfico de la infección es considerado uno de los mejores indicadores de la identidad de la especie (Horta et al., 2004).

Adicionalmente la rickettsiosis está asociada a diversos factores de riesgo los cuales se ven asociados mayormente a la presencia y

mantenimiento de los vectores artrópodos capaces de transmitirlos (Schriefer, Sacci et al. 1994) es interesante detectar la presencia de las especies rickettsiales en Mexicali pues existen distintos vectores entre ellas, por lo que la identificación de las mismas es fundamental para plantear estrategias de control y prevención de la enfermedad.

Tanto los huéspedes artrópodos como las especies de rickettsia varían de ciudad en ciudad debido a las condiciones climáticas, demográficas o incluso también por la idiosincrasia de sus habitantes.

En base a lo anterior se planteó el siguiente objetivo: Identificar mediante PCR punto final especies del género *Rickettsia* en sangre de pacientes humanos con signos compatibles a rickettsiosis atendidos por el Sector Salud, además de evaluar los factores de riesgo asociados en Mexicali, Baja California.

REVISION DE LITERATURA

Descripción de la enfermedad

La rickettsiosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias gram negativas del género *Rickettsia*, son intracelulares obligadas y habitan comúnmente en el citoplasma de las células endoteliales o en ocasiones en el núcleo.

La enfermedad tiene una distribución mundial siendo las bacterias más frecuentemente transmitidas por ectoparásitos, algunas de las especies son altamente patógenas para los humanos, quienes tan solo son huéspedes incidentales en el ciclo de transmisión (Buitrago-Medina and Pachón-Melo 2008).

Sin embargo, no todas las especies del género *Rickettsia* son zoonóticas, existen algunas que no se consideran patógenas o poseen patogenicidad desconocida en humanos (Horta et al., 2004). Por ser intracelulares son generalmente inestables cuando se separan de los componentes del huésped por lo cual necesitan de un vector artrópodo para sobrevivir fuera del mismo (Schuenke and Walker 1994). A excepción de *R. prowazekii* quien puede ser transmitido por aerosoles y además mantiene un ciclo asociado a la ardilla voladora (Svraka, Rolain et al. 2006).

Clasificación del género *Rickettsia*

Las bacterias que componen el género *Rickettsia* están clasificadas dentro de tres biogrupos. El primero denominado tifus de los matorrales es

endémico en Asia y se compone por un único integrante: *Orientia tsutsugamushi*. El grupo de las fiebres manchadas es el más amplio de los tres grupos, con al menos 20 especies descritas hasta hoy (Oteo, Nava et al. 2014) y finalmente el grupo donde se encuentran el tifus murino y epidémico, causados por *Rickettsia typhi* y *R. prowazekii*, respectivamente (Lee, Ip et al. 2008).

El grupo tifus y el de las FM comparten muchas particularidades, incluyendo una proteína conservada de membrana externa de 135 kDa designada como rOmpB y una lipoproteína de 17 kDa. Adicionalmente, las especies del grupo de las fiebres manchadas comparten entre sí una proteína de membrana externa de 170 a 198 kDa designada como rOmpA (Revista Médica de Chile, 2004).

Patogénesis

Las riquetsias son introducidas al huésped mediante la mordedura de una garrapata infectada (Raoult and Roux 1997). Al contactar con las células endoteliales de los vasos medianos y pequeños provocan su fagocitosis, se replican en el citoplasma (*R. rickettsii* se replica en núcleo y citoplasma) por fisión binaria simple sin daño detectable a las células hospederas y posteriormente son expulsadas por exocitosis para seguir infectando células contiguas (Rydkina, Turpin et al. 2010).

El daño a las células endoteliales provoca que se incremente la permeabilidad vascular y con ello escapen fluidos al intersticio, como

consecuencia, los síntomas clínicos predominantes serán atribuidos a la función alterada de la vasculatura, como por ejemplo, erupción cutánea la cual es característica de la enfermedad (Ellison, Clark et al. 2008; Rydkina, Turpin et al. 2010).

Las características moleculares y la expresión de productos génicos en particular por parte de las riquetsias contribuyen a las diferencias en la patogenicidad de cada especie. La expresión de OmpA por *R. rickettsii* le permite entrar y adherirse a las células endoteliales del huésped, sin embargo, *R. peacockii*, la cual está muy relacionada con *R. rickettsii*, posee un gen *ompA* que contiene tres codones prematuros “stop” volviéndola incapaz de expresar la proteína OmpA, a esta riquetsia se le considera no patogénica (Parola, Paddock et al. 2005).

Otro ejemplo de esto sería la fosfolipasa A producida por *R. prowazekii* la cual se encuentra involucrada en la internalización de la bacteria por parte de las células huésped susceptibles y también en la hemólisis de los eritrocitos humanos (Silverman, Santucci et al. 1992).

Análisis de comparación genómica de las cepas patogénicas y no patogénicas de riquetsias han detectado muchos factores relacionados con su patogenicidad, las riquetsias con genomas pequeños, como *R. prowazekii*, son más patogénicas para los humanos en comparación a las que tienen genomas de gran tamaño (Uchiyama 2012).

Cuadro 1. Características patológicas de agentes encontrados por IFI en Mexicali

<i>Rickettsia spp.</i>	Virulencia	Vector	Mortalidad
<i>R. prowazekii</i>	++++	<i>Pediculus humanus corporis</i>	2-60%
<i>R. typhi</i>	+++	<i>Xenopsylla cheopis</i>	1-4%
<i>R. rickettsii</i>	++++	<i>R. sanguineus</i>	65-80%

Gillespie et al., 2009; Openshaw et al., 2010; Republic of China Epidemiology Bulletin, 1995

Síntomas

Los síntomas de la enfermedad son muy inespecíficos, la cual puede tener un curso medio hasta muy severo, esta severidad se verá asociada con la virulencia del patógeno así como con factores propios del huésped (ej. Edad, sexo, diagnóstico tardío) (Dumler, Taylor et al. 1991). Por ejemplo, La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas después de un periodo de incubación que va desde 3-14 días ocasiona fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, náusea y usualmente una erupción maculopapular en las extremidades que posteriormente se vuelve petequiral y síntomas orgánicos como vómito y dolor abdominal. El retraso en el tratamiento puede resultar en enfermedad severa, hospitalización y secuelas como sordera, problemas de aprendizaje permanentes, amputación o muerte. Es raro que *R. rickettsii* cause síntomas

ligeros (Tzianabos, Anderson et al. 1989; Ammerman, Beier-Sexton et al. 2008; Graf, Chretien et al. 2008).

Además se cree que los lipopolisacáridos que existen en la membrana externa de las rickettsias participan en la erupción, pirexia y shock endotóxico observado durante el curso de la infección (Uchiyama 2012).

El deterioro a las células endoteliales causado por las rickettsias se ve reflejado en las características clínicas. En los pulmones y el cerebro causan las manifestaciones más graves de la rickettsiosis: edema pulmonar no cardiogénico, neumonía intersticial, cambios neurológicos focales, convulsiones y coma. Otras manifestaciones graves incluyen falla renal aguda, fenómenos hemorrágicos, edema periférico e hipotensión hipovolémica debido a la pérdida de fluidos intravasculares (Buitrago-Medina and Pachón-Melo 2008).

En el caso del grupo tifus el periodo de incubación es de aproximadamente una semana después de la cual se presentan síntomas como cefalea intensa, escalofríos, fiebre y mialgia. No ocasiona escara. La erupción comienza en la zona de la axila y zona superior del tronco en el quinto día de la enfermedad y se disemina al cuerpo evitando la cara, palmas y plantas (Republic of China Epidemiology Bulletin, 1995).

Vectores artrópodos

Al ser las rickettsias bacterias intracelulares obligadas, su transmisión se encuentra limitada por la distribución de sus vectores artrópodos (Schriefer,

Sacci et al. 1994). Los grupos poseen distintos vectores sin los cuales sería imposible que se mantuviera el ciclo de la rickettsiosis en la naturaleza. En el caso del grupo tifus son transmitidas a los humanos por piojos o pulgas, las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas son transmitidas principalmente por garrapatas (Covarrubias-Castro et al., 2007). Con excepción de *R. felis* la cual es transmitida por pulgas y *R. akari* por ácaros (Blair et al., 2004).

Las rickettsiosis transmitidas por pulga y piojo infectan a los humanos vía contaminación de la piel lacerada y superficies mucosas por medio de sus heces infectadas (CDC, 1998).

Muchas rickettsias pertenecientes al grupo FM infectan y se multiplican en casi todos los órganos de las garrapatas, particularmente en las glándulas salivales, lo que permite que la bacteria sea transmitida a huéspedes vertebrados durante la alimentación (Raoult and Roux 1997).

Rhipicephalus sanguineus, la garrapata café del perro, ha sido implicada recientemente como vector de *R. rickettsii* en el este de Arizona y ha sido identificada también como transmisora de FMMR en México (Eremeeva, Bosserman et al. 2006).

En el caso del grupo tifus, *R. prowazekii* es transmitida por el piojo del cuerpo (*Pediculus humanus corporis*) el cual posee una distribución mundial, a pesar de que el piojo de la cabeza (*Pediculus humanus capitis*) es capaz de mantener al patógeno experimentalmente su rol en la transmisión del mismo no está bien establecido (Azad 2007).

R. typhi por su parte es transmitida por la pulga *Xenopsylla cheopis*, la cual parasita ratas (*Rattus rattus* y *rattus norvegicus*) las cuales tienen una distribución mundial (Schriefer, Sacci et al. 1994).

Podría ser que estas asociaciones no siempre se respeten, por ejemplo, en un estudio realizado por Houhamdi y colaboradores en el 2006 se demostró que el piojo del cuerpo era capaz de mantener y excretar en sus heces *R. rickettsi* y *R. conorii*. Ellos infectaron 4000 piojos para realizar un estudio de casos y controles en conejos, al analizar las heces de los piojos encontraron que ellos fueron capaces de excretar la bacteria, además los conejos que fueron utilizados para alimentar a los piojos infectados contrajeron la enfermedad. Ellos llegaron a la conclusión de que el piojo del cuerpo podría estar contribuyendo a la transmisión de estos agentes a los humanos en lugares donde las condiciones epidemiológicas fueran favorables (zonas donde existiera hacinamiento y mala higiene). Por su parte *R. typhi* al parecer no es transmitida exclusivamente por la pulga *X. cheopis*, sino que existen otras 15 especies capaces de transmitir la infección naturalmente (Christou, Psaroulaki et al. 2010).

Rhipicephalus sanguineus

R. sanguineus es un artrópodo endofílico, es decir, prefiere alojarse en interiores de grietas y lugares oscuros, en acumulaciones de basura y escombros. Necesita de 3 hospederos (uno por cada estadio de vida) para alimentarse y completar su desarrollo, normalmente estos 3 hospederos son de

una sola especie, sin embargo pudiera llegar a alimentarse de distintas especies, o en condiciones donde existen temperaturas elevadas pudiera optar por elegir huéspedes atípicos como el humano (Dantas-Torres et al., 2010). Pueden infectar a vertebrados a través de su saliva y además tienen la capacidad de infectarse entre ellas, ya sea de un estadio al siguiente (larva, ninfa, adulta) o a su descendencia por infección transovárica (Satta, Chisu et al. 2011).

Se ha demostrado que esta garrapata posee la capacidad de inhibir por medio de su saliva la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, consiguiendo así no solo alimentarse y reproducirse con mayor facilidad, sino aumentar sus posibilidades de transmitir patógenos (Oliveira, Sa-Nunes et al. 2011).

Son más activas en los meses de primavera y verano, durante los cuales de cumplirse óptimamente su ciclo, la hembra puede llegar a ovopositar de 1,500 a 4,000 huevecillos (Dantas-Torres et al., 2010).

R. sanguineus en Mexicali

La garrapata café del perro, como también se le conoce, es la única que se ha reportado actualmente en Mexicali (Tinoco-Gracia et al., 2009) lo cual sugiere es la responsable de transmitir patógenos riquetsiales.

Un estudio realizado en 384 perros tanto de clínicas veterinarias como del Centro Municipal de Control animal de Mexicali y divididos en 3 grados de marginalidad (alta, mediana y baja), demostró que no existía diferencia

estadísticamente significativa entre la seropositividad en los mismos y la zona de marginalidad a la que pertenecían (Tinoco-Gracia et al., 2009). Este estudio se realizó con la finalidad de demostrar que tanto el vector como la enfermedad estaban distribuidos por toda la ciudad, desmintiendo así que solo las zonas marginadas eran susceptibles de contraer riquetsiosis.

Distribución de los agentes riquetsiales.

A lo largo del continente americano se han descrito distintas especies del género *Rickettsia* pertenecientes tanto al grupo de las fiebres manchadas como al grupo tifus, las zoonosis transmitidas por garrapatas son las enfermedades transmitidas por vectores más antiguas. La primera descripción de un caso clínico de FMMR fue reportada en 1899. Durante aproximadamente 90 años más *R. rickettsii* fue la única riquetsia asociada con enfermedad en humanos en el hemisferio oeste.

Durante el siglo XX muchas otras riquetsias del género de las fiebres manchadas fueron descritas o caracterizadas de manera incompleta en garrapatas de norte américa, incluyendo *R. montanensis* y *R. rhipicephali* las cuales son consideradas no patogénicas (Parola, Paddock et al. 2005). Y *R. parkerii* que actualmente se considera patógena (Graf et al., 2008). La fiebre manchada de las montañas rocosas ha sido reportada en los Estados Unidos, México, Panamá, Colombia, Brasil, Argentina y Costa Rica (Hun et al., 2008).

En México se han descrito otras especies además de *R. rickettsii* como son *R. felis* en Yucatán por técnicas moleculares (Zavala-Velázquez et al.,

2000), *R. Akari* en la Comarca Lagunera por serología, (Zavala-Velázquez et al., 1996), *R. prowazekii* en la ciudad de México por aislamiento (Bustamante y Varela, 1947) y *R. typhi* en Yucatán por PCR la cual se presume tiene una distribución en todo el norte de México (Zavala-Castro et al., 2009).

Epidemiología

Antecedentes

La FMMR fue descrita por primera vez en los Estados Unidos, es la enfermedad fatal transmitida por garrapatas más reportada en este país (Holman et al., 2001). E.E. U.U. cuenta con un rango de casos fatales del 1% sin embargo este puede aproximarse a 7% en algunas regiones donde la FMMR es altamente endémica (Kato et al., 2013). La fiebre manchada de las montañas rocosas, es considerada una enfermedad de notificación obligatoria (Graf et al., 2008). Durante los años que comprenden del 2000 al 2007 la incidencia anual reportada de fiebre manchada de las montañas rocosas se incrementó del 1.7-7 casos por millón de personas, el rango más grande jamás reportado (Openshaw, Swerdlow et al. 2010).

También en los Estados Unidos Graf y colaboradores (2008) realizaron un estudio de seroprevalencia con una muestra de 10,000 sueros provenientes de militares elegidos aleatoriamente para el grupo de las fiebres manchadas teniendo como resultado un 6% (IC= 95%, 5.5%-6.4%) de positividad.

Para determinar la seroprevalencia en humanos y perros en Catalonia, España Segura-Porta y colaboradores (1998) realizaron un estudio en 150

muestras de pacientes asintomáticos y obtuvieron un resultado del 8% (IC=95%, 4.6%-13.5%).

En Brasil se realizó un estudio de seroprevalencia en humanos (n=50), caballos (n=22), perros (n=16) y burros (n=4) saludables de tres granjas del municipio de Pedreira, donde la fiebre manchada brasileña es endémica y no encontraron positividad en humanos ni en burros, pero si en perros (31.3%) y en los caballos (77.3%). Cabe mencionar que muestrearon en 90% de las personas y el 100% de los animales (Horta et al., 2004).

Situación en Mexicali

Entre los años 2008-2009 ocurrió un brote de fiebre manchada de las montañas rocosas desde septiembre del 2008 hasta marzo del 2009 en humanos, el cual estuvo asociado a defunciones (Sánchez et al., 2009).

Ese mismo año se realizó el primer estudio por técnicas moleculares (PCR) para determinar la presencia de rickettsiosis en humanos, fue extraído DNA de tejido (riñón) y posteriormente se le realizó PCR en busca de un fragmento del gen citrato sintasa (*gltA*). El producto obtenido se envió a secuenciar demostrando de esta manera por primera vez la presencia de *R. rickettsii* por PCR en humanos de Mexicali (Tinoco-Gracia et al., 2009).

En el 2009 en Mexicali, Tinoco-Gracia y colaboradores realizaron un estudio en 384 perros de clínicas veterinarias y encontraron que existía una prevalencia de garrapatas de 40.1% y que en su totalidad pertenecían a la especie *R. sanguineus*.

Por otro lado un estudio realizado por Eremeeva y colaboradores (2011) también en la ciudad de Mexicali, demostró que la garrapata *R. sanguineus* es capaz de morder al humano e inocularle la bacteria *R. rickettsii* pudiendo así transmitirle la enfermedad.

Las riquetsiosis poseen un carácter emergente y re-emergente (Oteo, Nava et al. 2014). La abundancia de un vector en particular, la prevalencia de la infección en las garrapatas y la prevalencia de huéspedes naturales de las mismas que entren en contacto con humanos son elementos que afectan la frecuencia de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Parola, Paddock et al. 2005).

Factores de riesgo

Sexo

El estudio serológico realizado en 10, 000 personas de la milicia en servicio durante el año de 1997 mencionado con anterioridad mostró una seropositividad mayor en hombres que en mujeres por ELISA (OR 2.2 IC 95% 1.6-3.1) estos hombres eran en su mayoría jóvenes (Graf et al., 2008).

Edad

En un estudio serológico realizado en Cameroon, África evaluaron distintos factores de riesgo en personas seropositivas a *R. africae*, entre ellos la edad y encontraron que la población de riesgo (OR=2.2 IC 95% 1.4-3.4) eran los adultos de entre 36-45 años de edad, ellos concluyen que se podría

deber a los roles ocupacionales o recreativos de este grupo (Ndip, Biswas et al. 2011).

En otro estudio realizado en personas de todas las edades para determinar la seroprevalencia de *R. felis* en Catalonia, España también encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la edad (media de 61 años en los sujetos seropositivos) y la seropositividad a *R. felis* [$P=0.039$, OR=6.102 (1.3-29.1)]. En este estudio concluyen que probablemente se asocie la edad a la seropositividad por la oportunidad que se presta a lo largo de los años de contraer la enfermedad (NOGUERAS, CARDENOSA et al. 2006).

Tratamiento

Se realizó un estudio en el cual se muestrearon 6388 expedientes de casos probables y confirmados de FMMR desde 1981-1998 en Estados Unidos con el fin de comparar características epidemiológicas y clínicas de casos fatales y no fatales. Ellos encontraron que los pacientes de edad avanzada tratados únicamente con cloranfenicol, pacientes a los cuales no se les administraron tetraciclinas como tratamiento primario y pacientes a los cuales el tratamiento se les retraso más de 5 días después del inicio de síntomas estuvieron con mayor riesgo de morir (Holman, Paddock et al. 2001).

Otro estudio realizado en un hospital público de Marseille, Francia evaluó en un periodo de 10 años (1999-2009) 161 casos de fiebre manchada mediterránea (*R. conorii*) y encontraron una asociación entre el tratamiento antibiótico y la severidad de la enfermedad. La administración de doxiciclina

previo al deterioro de la enfermedad protegió a los pacientes de desarrollar un cuadro severo de FMM (un caso severo se definió como dos o más órganos afectados o la muerte del paciente), por otro lado, se encontró una asociación estadísticamente significativa (RR 2.53, IC 95% 1.40-4.55) entre el uso de fluorquinolonas y la severidad de la enfermedad (Botelho-Nevers, Rovey et al. 2011).

Contacto con animales

En un estudio realizado en Villeta, Cundinamarca, Colombia se evaluaron entre otras variables el ser propietario de animales domésticos o la circulación libre de los mismos dentro y fuera de la casa y no encontraron asociación estadística ($p=0.6$) entre estas variables y la seropositividad (Hidalgo et al., 2007).

Diagnóstico

Tinción

A pesar de estar clasificadas como gram negativas, se tiñen pobremente mediante esta tinción, siendo más apropiada la tinción Giménez, Giemsa y naranja de acridina (Oteo, Nava et al. 2014).

IFI

Es la técnica más utilizada para el diagnóstico de rickettsiosis, se realiza en un suero sospechoso en búsqueda de anticuerpos contra un patógeno problema (en este caso, *Rickettsia spp.*) para esto se utiliza una anti-globulina

humana marcada con fluoresceína, si la reacción es positiva se podrá visualizar por medio de un microscopio de fluoresceína (Oteo, Nava et al., 2014). La prueba cuenta con un 82% de sensibilidad un 91,7% de especificidad de acuerdo a Anaya y colaboradores (2007).

La rickettsiosis es una enfermedad de curso agudo, con un periodo de incubación de 3 a 14 días (Tzianabos, Anderson et al. 1989) pudiendo entonces presentar síntomas a partir de los 3 días post exposición. Cuando se registran títulos mayores de 1:1024 se puede sospechar de una infección reciente (Scorpio, Wachtman et al. 2008).

A pesar de que IFI es considerada la prueba oro, el diagnóstico específico puede no estar disponible hasta que el paciente se haya recuperado o haya fallecido (La Scola and Raoult 1997), por lo que se requieren las denominadas “muestras pareadas” (Zavala-Castro et al., 2009), que consisten en la toma de una primer muestra cuando el paciente se presenta a consulta y una segunda muestra dos semanas después. Existen además reacciones cruzadas entre las distintas especies (Hechemy et al., 1989), volviendo más complicado el diagnóstico por técnicas serológicas, pues para tener certeza de que no existen se deben recurrir a otros métodos como son la adsorción cruzada o Western blot (Horta et al., 2004).

Debido a que estos métodos en ocasiones no distinguen entre especies del grupo de las fiebres manchadas, ha habido especulación de que *R. parkeri* (la cual recientemente se describió como patógena para los humanos) u otra

riquetsia del grupo de las FM fuera responsable de algunos casos diagnosticados como FMMR. (Graf et al., 2008).

Cuando existen reacciones cruzadas el origen geográfico de la infección es considerado uno de los mejores indicadores de la identidad de la especie, el evaluar un suero problema contra la posible especie de riquetsia que se sabe habita en cierta área geográfica es lo ideal. A menudo los títulos de anticuerpos homólogos son más elevados que los heterólogos, así, la diferencia entre ambos títulos puede ser tan alta como para discriminar entre las especies riquetsiales de las cuales se sospecha (Horta et al., 2004).

Debido a que en Mexicali aún no han sido determinadas las especies de riquetsias que habitan en la ciudad, no es posible determinar de manera certera cuales son los anticuerpos homólogos en una reacción de inmunofluorescencia.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta rápida, sensible (79%) y específica para la detección e identificación de riquetsias en distintos tipos de muestras como sangre, biopsia cutánea, líquido céfalo raquídeo, exudados, raspado de escaras y garrapatas (Oteo, Nava et al., 2014).

A la fecha, el diagnóstico de las infecciones riquetsiales es confirmado más frecuentemente por técnicas serológicas, sin embargo, los anticuerpos no son detectados sino hasta la segunda semana de enfermedad para cualquier

enfermedad riquetsial, además un resultado positivo puede no indicar una infección aguda (Boretti, Perreten et al. 2009).

La técnica básica del PCR incluye ciclos repetidos en los cuales se amplifica una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada. Cada ciclo consiste en 3 pasos, el primero es la desnaturalización del DNA, en el cual la doble hebra del DNA blanco se separa; alineación de los iniciadores, la cual se lleva a una temperatura más baja en la cual los iniciadores se alinean a sus secuencias blanco complementarias y finalmente la extensión donde la DNA polimerasa extiende las secuencias entre los iniciadores. Al término de cada ciclo (el cual consiste en los 3 pasos mencionados) las cantidades de producto de PCR son teóricamente dobladas. Todo el procedimiento se lleva a cabo en un termociclador programado (Steinbach and Shetty 2001).

El PCR punto final tiene un límite de detección de una riquetsia por reacción (Stenos et al., 2005), esto junto con la cualidad que posee para detectar la presencia del patógeno de manera aguda (Schriefer et al., 1994) nos hizo elegirlo como nuestro método diagnóstico.

PCR en sangre

Tzianabos y colaboradores en 1989 ya habían estandarizado un método para realizar PCR punto final a partir de coágulos humanos, en su trabajo ellos concluyeron que era posible realizar dicha técnica de manera exitosa en sangre humana (Tzianabos et al., 1989). En Texas en el año de 1993 Schriefer y colaboradores realizaron un estudio en el cual colectaron sangre humana en

búsqueda de *R. typhi* y otro agente similar (ELB) por PCR y encontraron *R. typhi* en 5 pacientes. Otra evidencia de la eficacia del PCR en sangre humana puede ser encontrada en el trabajo realizado por Zavala-Castro y colaboradores (2009) donde encontraron por primera vez en Yucatán evidencia en sangre humana de la existencia de *R. typhi* en dicho estado. Estos ejemplos pretenden demostrar la eficacia de realizar PCR en sangre. Tzianabos y colaboradores (1989) citaban que en las fases tempranas de la enfermedad posiblemente no existan suficientes riquetsias circulando en sangre por lo cual no se detectarían por PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en Mexicali misma que es la capital del Estado de Baja California, la cual cuenta con una población de 936,145 habitantes en la Zona Metropolitana (INEGI, 2010). Se encuentra ubicada en las coordenadas 32° 39' 48" de latitud norte. Mexicali es una ciudad fronteriza, colindando con el Estado de California, EE. UU., específicamente con la ciudad de Calexico. El área geográfica correspondiente de la zona metropolitana de Mexicali es de 202.50 km² (INEGI, 2010).

En período de verano Mexicali posee una de las temperaturas más altas del país, además de ser de las ciudades con más bajo nivel de precipitación anual. Las temperaturas diurnas superan los 35°C prácticamente todos los días

de verano, y pueden alcanzar valores térmicos de hasta 46°C e índice de calor superior a 60°C cada año. Las noches son cálidas y en ocasiones calurosas llegando a superar los 30°C. El invierno es suave y fresco, muy rara vez se presentan heladas (Servicio meteorológico Nacional, 2012).

Este estudio se llevó a cabo durante un año (febrero 2013-febrero 2014) y tuvo lugar dentro de las instalaciones del Laboratorio de Salud Pública Veterinaria ubicado en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

La población estudiada se compone de habitantes de la ciudad de Mexicali, Baja California, sin distinción de sexo ni edad, que acudieron a atenderse a alguna de las salas de urgencias del sector salud y que además presentaron signos y síntomas compatibles a la enfermedad. A la llegada de los pacientes se les evaluó por medio de una ruta crítica (Anexo) sus distintos signos y síntomas siendo descartadas las personas que no calificaban como un caso probable (la definición de un caso probable está incluida en el Anexo).

Tanto las muestras como sus respectivos cuestionarios epidemiológicos fueron proporcionados al Laboratorio de Salud Pública Veterinaria por el Instituto de Servicios de Salud del Estado de Baja California (ISESALUD BC).

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)

enmendada en la 64^a Asamblea General llevada a cabo en Fortaleza, Brasil, Octubre del 2013.

Además este estudio cumplió con la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Metodología

Toma de muestra

Las muestras de sangre fueron colectadas por el personal del sector salud y enviadas en tubos con anticoagulante (EDTA o citrato de sodio) en hieleras al Laboratorio de Salud Pública Veterinaria (IICV-UABC) con el nombre del paciente y la fecha acompañados de un cuestionario epidemiológico nacional que corresponde a enfermedades transmitidas por vectores (Anexo).

Diagnóstico de Rickettsia spp. mediante PCR

Cada una de las muestras de sangre fue procesada con el kit QiAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la preparación de la mezcla maestra se utilizó el Hot Start Master mix (Promega®).

El PCR para el gen citrato sintasa (*gltA*) de *Rickettsia* spp. fue realizado en todas las muestras en un termociclador Techne Genius® (modelo

FGEN02TP, Cambridge, Inglaterra) bajo el siguiente protocolo: el DNA de doble hebra fue desnaturalizado a 95°C por 5 minutos, los iniciadores fueron alineados a 52°C por 30 segundos y la extensión ocurrió a 72°C por 7 minutos. Se necesitaron 40 ciclos en total para la replicación del fragmento de DNA esperado (Labruna, Whitworth et al. 2004).

A las muestras que resultaron positivas al gen citrato sintasa se les realizó otro PCR con iniciadores que amplifican el gen de la proteína de membrana externa A (*ompA*), que se presenta fundamentalmente en las riquetsias del grupo de las fiebres manchadas (Regnery, Spruill et al. 1991). El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 45 segundos en un total de 35 ciclos (Oteo, Nava et al., 2014).

Electroforesis

Se prosiguió a preparar un gel de agarosa (Agarose, LE, Promega Co., USA) al 1% con solución amortiguadora TAE 1X y el marcador fluorescente (Safeview® abm Inc., Canadá).

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en el estudio

Gen	Iniciadores	Pb	Referencia
<i>GltA</i>	CS-78 (5'GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT) CS-323 (5'GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT)	401	Labruna et al., 2004
<i>ompA</i>	Rr190.70p (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) Rr190.602n (5'- AGTGCAGCATTGCTCCCCCT)	532	Hun et al., 2008

El gel se sumerge en la caja de electroforesis la cual contiene solución TAE suficiente para cubrir la superficie del gel por encima de 2mm. Una vez dentro se le colocan los productos del PCR en los pozos, el primer pozo de izquierda a derecha contiene el marcador de 100 pares de bases (100bp opti-DNA marker®, abm Inc., Canadá) después están los productos de PCR y finalmente los controles positivo y negativo.

El gel es visualizado dentro de una cámara de rayos UV. Si el resultado es positivo se visualizará una banda con un peso específico el cual se mide mediante el marcador de peso molecular.

Las bandas que eran visibles a simple vista fueron tomadas como positivas; si existían bandas que no fuesen tan intensas, pero resultaban sospechosas, se les realizaba un re amplificado el cual consistía en introducirle 0.1µl de producto de PCR a 45µl de Master mix y posteriormente realizarle PCR con el mismo protocolo descrito anteriormente.

Sin embargo, si aún re amplificadas las bandas resultaban ser tenues eran considerabas como positivas ya que no solo se realizaba el protocolo con fines de investigación sino también diagnósticos.

Finalmente los productos negativos al gen *ompA* se enviaron a secuenciar al laboratorio Macrogen® ubicado en la República de Corea.

Las secuencias obtenidas fueron introducidas al programa BLAST del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI).

Factores de riesgo

Al recibir una muestra y procesarla, el resultado del PCR se anotó en una bitácora en Excel. También se anotaron los datos de todas las variables provenientes del cuestionario epidemiológico para su posterior evaluación.

Análisis estadístico

Con el fin de almacenar los valores de las variables a lo largo del estudio se realizó una base de datos en el programa Excel® (Microsoft 2007) donde se capturaron los datos de 142 personas, sin embargo, 22 de estas no fueron incluidas en el estudio por no cumplir con los criterios establecidos.

Analizamos las características de la población de estudio como el sexo, la edad, el hospital de atención, la administración de doxiciclina previo a la toma de muestra y si había fallecido.

Además se incluyeron las variables que de acuerdo a la historia natural de la enfermedad podrían representar un riesgo a la población como eran contacto con perros y/o garrapatas, conocimiento de algún enfermo con síntomas similares a los suyos en su comunidad, viaje fuera de la ciudad en los últimos 20 días y a cuantas consultas previas había asistido.

Con estas variables se construyó un cuadro descriptivo el cual se encuentra en el apartado de resultados (Cuadro No. 4).

Posteriormente las variables se introdujeron al programa Statistix® para calcular su razón de momios. Existieron variables de las cuales no contamos con la información de los 120 individuos por lo que se omitió su análisis.

RESULTADOS

Análisis molecular

En total se analizaron 120 muestras de las cuales 30 (25%) fueron detectadas como positivas a *Rickettsia* spp. De estas muestras se encontró un 63.33% (19/30) de positividad al grupo de las fiebres manchadas.

Se enviaron a secuenciar 13 de los 30 productos positivos y se obtuvieron 8 resultados al introducirse al programa “BLAST”.

Cuadro 3. Resultados de secuenciación

No.	Gen secuenciado	Resultado
1	<i>ompA</i>	<i>R. rickettsii</i>
2	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>
3	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>
4	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>
5	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>
6	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>
7	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>
8	<i>glta</i>	<i>R. rickettsii</i>

Figura 1. Producto positivo a *Rickettsia* spp. con marcador de 50pb.

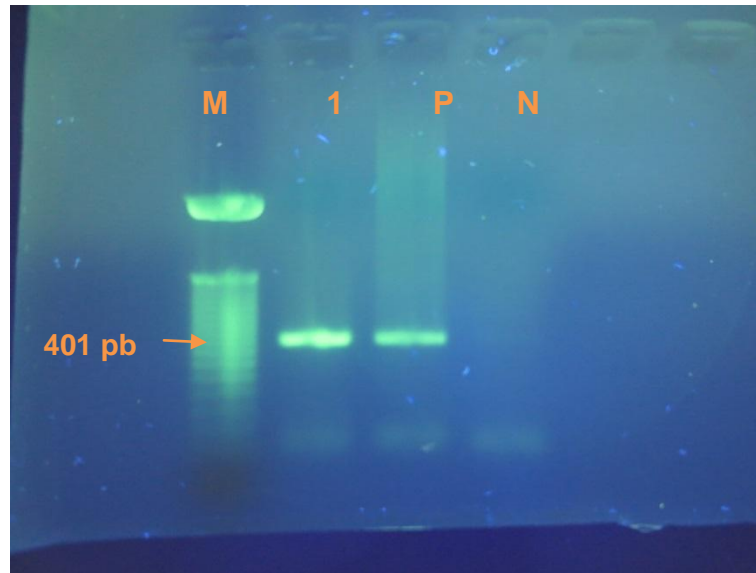


Figura 2. Secuencia positiva a *R. rickettsii* con un 98% de homología con iniciadores para el gen *ompA*.

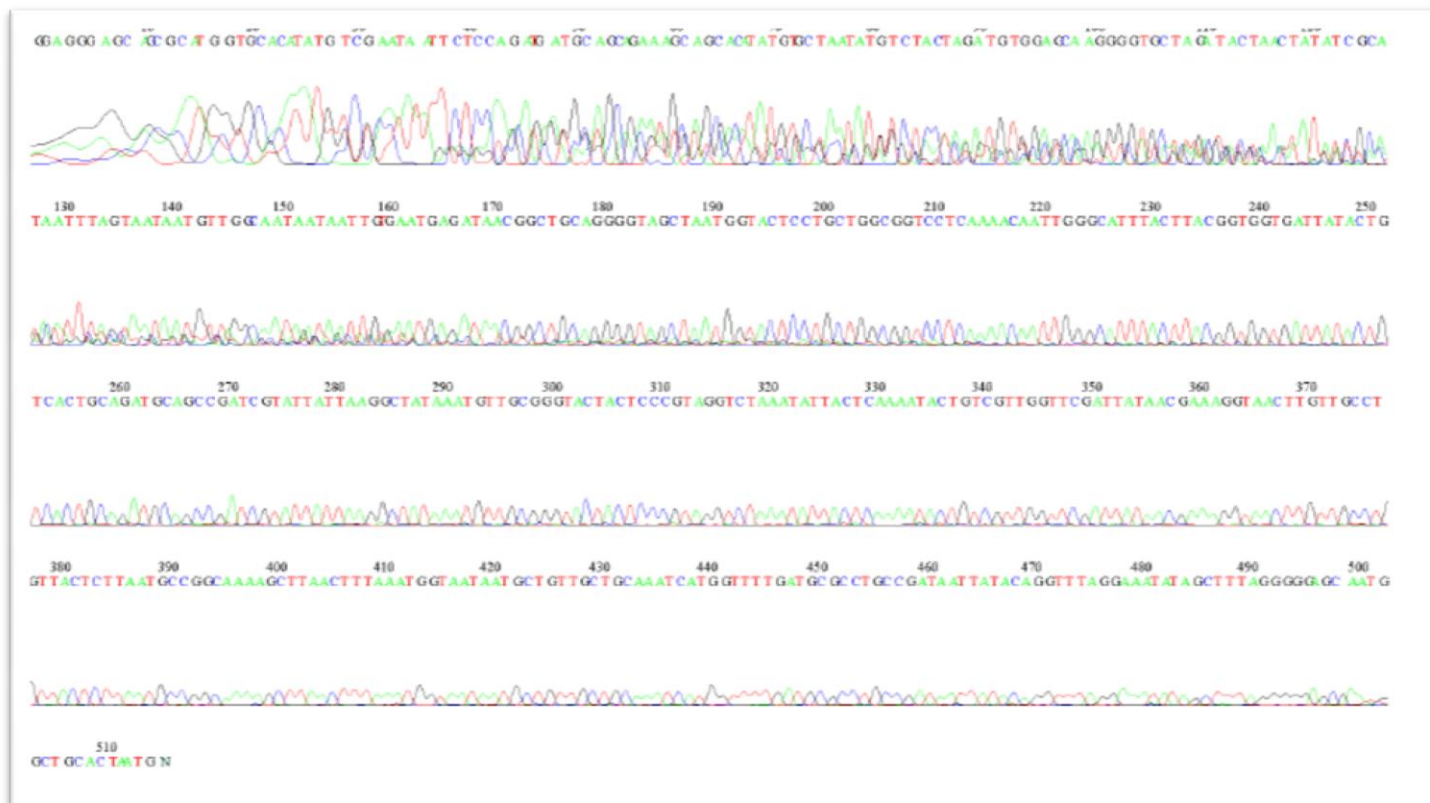
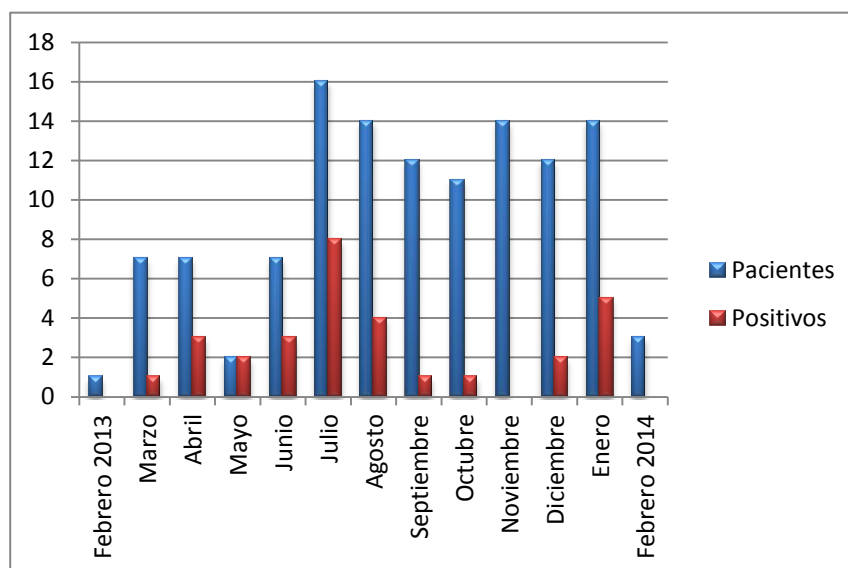


Figura 3. Mes de solicitud de atención por parte del Sector Salud



Cuadro 4. Características de la población estudiada.

Variable	Descripción		Variable	Descripción	
	N	n		N	N
Sexo			Perros c/ garrapatas		
Masculino	60	15	Si hubo contacto	100	24
Femenino	60	15	Solo perros	5	3
Edad			Solo garrapatas	7	1
1-25	85	18	Sin registro	8	2
26-65	54	12	Fallecimientos		
Hospital de atención			Si	-	10
General	95	27	No	-	20
IMSS 30	13	3	PEC		
IMSS 31	12	0	Si tenían conocimiento	19	5
Viaje FC			No tenían conocimiento	92	23
Si	3	2	Sin registro	9	2
No	117	28	Consultas previas		
Tratamiento Previo			0	84	17
Si	7	2	1	10	2
No	113	28	2	20	8
			≥3	6	3
TOTAL	120	30		120	30

*FC=fuera de la ciudad. PEC=personas enfermas en la comunidad. Se muestran fallecimientos asociados a *Rickettsia* spp.

Análisis de factores de riesgo

En la figura número tres se observa que la búsqueda de atención médica por parte de la población por sospecha de riquetsiosis, así como la incidencia, es más elevada en el mes de Julio (13.33%), el cual es el más caluroso del año (Servicio Meteorológico Nacional Mexicano, 2010). La historia natural del vector indica no solo que esos meses son en los cuales hay mayor crecimiento de la población de garrapatas sino que también de acuerdo a Dantas-Torres (2010) tiende a alimentarse del humano en temperaturas elevadas incrementando el riesgo de parasitismo en los mismos, lo cual podría explicar el incremento que se observa en esta gráfica en dicho mes.

Además se puede observar que la enfermedad sigue presentándose en los meses de otoño e invierno lo cual es un comportamiento atípico, sin embargo, de acuerdo al Servicio Meteorológico Nacional (2010) la temperatura media anual en la ciudad es de 23°C. Se ha demostrado que la garrapata café del perro es capaz de mantener su ciclo de vida adecuadamente a una temperatura entre 20-35°C (Dantas-Torres et al., 2010), por lo tanto las condiciones climáticas de Mexicali son ideales para la supervivencia del artrópodo.

Sexo

No se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro 5. Magnitud de asociación entre los casos de riquetsiosis y el estrato de sexo de los pacientes.

Estrato	R +	R -	TOTAL	O R	95% IC
Masculino	15	45	60	1.0	
Femenino	15	45	60	1.0	0.43 , 2.28
Total	30	90	120		

Valor $P=1.0$

Edad

El rango de edad fue de 1-66 años, la media de 21 años, la mediana de 17 años y la moda de 7 años.

Cuadro 6. Desglose de positividad por edades.

Edad	Pacientes evaluados	Positivos
1-12	45	12
13-25	40	10
26-40	17	5
>41	18	3
Total	120	30

Cuadro 7. Magnitud de asociación entre los casos de riquetsiosis y el estrato de edad de los pacientes.

Estrato	R +	R -	TOTAL	O R	95% IC
1-18 años	18	48	66	1.5*	
19-65 años	12	49	54	1.0	0.66 , 3.51
Total	30	90	120		

Valor $P= 0.31$

DISCUSIÓN

De acuerdo a este estudio existe solo una especie de riquetsia en la ciudad, sin embargo, debemos tomar en cuenta que este estudio se realizó únicamente en sangre humana por lo cual sugerimos futuros estudios donde la muestra analizada sea tejido, pues la bacteria se aloja en las células endoteliales (Buitrago-Medina y Pachón Melo, 2008).

Cuando se realizó la evaluación estadística de los cuestionarios epidemiológicos se observó que existen muchos factores que podrían retrasar el diagnóstico oportuno como son una anamnesis deficiente, variables cuya respuesta no fue anotada, o la omisión de datos epidemiológicos relevantes en el cuestionario como por ejemplo si el paciente ha frecuentado zonas de riesgo o cuando tuvieron inicio los síntomas.

Edad

De acuerdo a la información obtenida no se encontró asociación estadística entre la edad y el riesgo de contraer rickettsiosis, más por los datos capturados en los cuadros No. 4 y 6 se puede observar que la población menor de 18 años posee las cifras más elevadas en cuanto a positividad a la enfermedad. Al desglosar un poco más los grupos de edad se observa que los niños y jóvenes son la población más vulnerable a contraer la enfermedad probablemente porque son quienes realizan actividades recreativas en sitios infestados como parques, lotes baldíos o en la tierra.

Viaje fuera de la ciudad

En cuanto a las dos personas positivas que realizaron un viaje fuera de la ciudad (el cual por definición debía acontecer mínimo dos semanas previas a la sospecha de rickettsiosis) una de ellas viajó a Tijuana, Baja California (Zona de los Pinos) sin proporcionar más datos de su estadía. Sin embargo, esta persona habitaba en un domicilio en la ciudad de Mexicali (Fraccionamiento Reforma) el cual estaba infestado de garrapatas (comunicación personal) por lo que es más probable que el contacto con el vector haya ocurrido en el mismo.

El otro paciente viajó a San Francisco, Ca. donde manifestó haber realizado actividades recreativas en las cuales se internó en maleza y zonas despobladas por lo cual no se puede descartar que el sitio de contagio haya sido esta ciudad (comunicación personal).

Ambos pacientes resultaron positivos a *R. rickettsii* por secuenciación.

Tratamiento previo

Siete personas recibieron tratamiento adecuado (doxiciclina) contra rickettsiosis antes de la toma de muestra (siendo “antes” equivalente a por lo menos un día previo) 5 obtuvieron resultados negativos a PCR lo cual se pudieran deber a la administración de este fármaco, sin embargo, dos personas resultaron positivas aún con el tratamiento, por lo cual posiblemente tenían una bacteremia muy severa la cual al momento de la toma de muestra aún no disminuía y por lo tanto pudo ser detectada por dicha técnica molecular.

Exposición a perros con garrapatas

El 80% de las personas que comentaron haber tenido contacto o poseer perros con garrapatas resultaron positivos a *Rickettsia spp.* A pesar de que se encontró un elevado porcentaje de perros con garrapatas (83.3%), no se pudo evaluar el riesgo asociado a esta variable (Odds ratio) debido a que este campo no fue capturado en su totalidad en los 120 cuestionarios epidemiológicos (8 ocasiones).

Las personas que manifestaron haber convivido solo con perros mencionaron que los mismos no tenían garrapatas, sin embargo, como se puede ver en el cuadro No. 4 existen 3 personas positivas con esta característica. Los cuestionarios epidemiológicos incluyen una sección denominada “observaciones” en la cual se anotaban cuestiones relevantes que el paciente relataba al momento de la anamnesis; en ocasiones el paciente mencionaba encontrar garrapatas en la vivienda, entonces era capturado en el

campo “garrapatas” de nuestra base de datos (junto con las personas que mencionaban en el campo adecuado haber convivido sólo con garrapatas).

Consulta Previa

Del total de personas atendidas en el Sector Salud el 30% acudió a mínimo una consulta previa. 13 personas positivas (43.3%) acudieron a mínimo 1 consulta previo a la sospecha de rickettsiosis y 5 personas que tuvieron 1 o más consultas previas antes de ser diagnosticados como positivos a *Rickettsia spp.* fallecieron (38.46%), sin embargo este hallazgo resultó ser no significativo ($P=0.9544$, $OR= 0.9677$ $IC=95\%$). Existe evidencia en la literatura (Holman, et al., 2001; Lee et al., 2008) de que las personas que presentan un retraso en la administración del tratamiento adecuado están bajo un mayor riesgo de perecer.

CONCLUSIONES

Es imperativo poner más énfasis en la importancia de un diagnóstico oportuno empezando por una anamnesis completa y bien redactada, la cual a su vez disminuirá o evitará el número de consultas previas traducándose en menos decesos.

Los factores de riesgo que resultaron ser no significativos necesitan ser re-evaluados para corroborar que efectivamente no están afectando nuestra ciudad y de ser así plantearse nuevas hipótesis para encontrar el origen de la alta incidencia en comparación con otras partes del mundo como Estados Unidos, por ejemplo.

Las muestras que fueron tomadas después de administrárseles el tratamiento contra rickettsiosis pudieron haber sido tanto verdaderos como falsos negativos. Es importante tomar en cuenta esto cuando se envían las muestras para su análisis por PCR para garantizar un diagnóstico confiable.

Los porcentajes calculados de personas en contacto con el vector son muy elevados y por lo tanto preocupantes ya que indican que todas ellas no están cumpliendo con un programa preventivo en su hogar y por lo tanto se encuentran en un potencial riesgo de enfermarse o morir.

Se observó una marcada diferencia entre los dos estratos de edad utilizados en el Odds ratio y la positividad a la enfermedad. Esto probablemente se deba a los hábitos propios de los niños y jóvenes los cuales muchas veces duermen con las mascotas parasitadas o frecuentan lugares infestados sin percatarse de la mordedura del artrópodo.

Los médicos humanos, médicos veterinarios y la población en general necesitan concientizarse de la importancia de esta enfermedad para prevenirla y controlarla.

Se sugieren futuros estudios de prevalencia con números de muestra más elevados que incluyan más hospitales de la ciudad y estudios sobre los factores de riesgo en la vivienda.

La determinación de las distintas especies únicamente por técnicas moleculares tuvo muchos inconvenientes por el tipo de muestra que se utilizó

para realizar el estudio (sangre periférica). Sugerimos futuros estudios en los cuales se realicen cultivos bacterianos además de técnicas moleculares.

LITERATURA CITADA

- Ammerman, N., M. Beier-Sexton, et al. (2008). "Laboratory maintenance of *Rickettsia rickettsii*." Curr Protoc Microbiol **Chapter 3**: Unit 3A.5.
- Azad, A. F. (2007). "Pathogenic Rickettsiae as Bioterrorism Agents." Clinical Infectious Diseases **45**(Supplement_1): S52-55.
- Boretti, F. S., A. Perreten, et al. (2009). "Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* Infection in Dogs, Foxes, Humans, and Ixodes Ticks." Appl. Envir. Microbiol. **75**(10): 3230-3237.
- Botelho-Nevers, E., C. Rovey, et al. (2011). "Analysis of risk factors for malignant Mediterranean spotted fever indicates that fluoroquinolone treatment has a deleterious effect." J. Antimicrob. Chemother. **66**(8): 1821-1830.
- Buitrago-Medina, D. A. and H. E. Pachón-Melo (2008). Epidemiología de las Rickettsiosis. Facultad Nacional de Salud Pública Héctor Abad Gómez. Bogotá, Universidad de Antioquia. **Especialistas en Epidemiología**: 88.
- Christou, C., A. Psaroulaki, et al. (2010). "*Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in *Xenopsylla cheopis* and *Leptopsylla segnis* Parasitizing Rats in Cyprus." Am J Trop Med Hyg **83**(6): 1301-1304.
- Dumler, J., J. Taylor, et al. (1991). "Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987." JAMA **266**(10): 1365-1370.
- Ellison, D. W., T. R. Clark, et al. (2008). "Genomic Comparison of Virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and Avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa." Infect. Immun. **76**(2): 542-550.
- Eremeeva, M. E., E. A. Bosserman, et al. (2006). "Isolation and Identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks Collected in Arizona." Appl. Envir. Microbiol. **72**(8): 5569-5577.
- Graf, P. C. F., J.-P. Chretien, et al. (2008). "Prevalence of Seropositivity to Spotted Fever Group Rickettsiae and *Anaplasma phagocytophilum* in a Large, Demographically Diverse US Sample." Clinical Infectious Diseases **46**(1): 70-77.
- Holman, R. C., C. D. Paddock, et al. (2001). "Analysis of Risk Factors for Fatal Rocky Mountain Spotted Fever: Evidence for Superiority of Tetracyclines for Therapy." The Journal of Infectious Disease **184**(11): 1437-1444.
- Jensenius, M., P.-E. Fournier, et al. (2004). "Comparison of Immunofluorescence, Western Blotting, and Cross-Adsorption Assays for Diagnosis of African Tick Bite Fever." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **11**(4): 786-788.
- La Scola, B. and D. Raoult (1997). "Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases." J. Clin. Microbiol. **35**(11): 2715-2727.
- La Scola, B., L. Rydkina, et al. (2000). "Serological Differentiation of Murine Typhus and Epidemic Typhus Using Cross-Adsorption and Western Blotting." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **7**(4): 612-616.

- Labruna, M. B., T. Whitworth, et al. (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**(1): 90-98.
- Lee, N., M. Ip, et al. (2008). "Risk Factors Associated with Life-threatening Rickettsial Infections." Am J Trop Med Hyg **78**(6): 973-978.
- Ndip, L. M., H. H. Biswas, et al. (2011). "Risk Factors for African Tick-Bite Fever in Rural Central Africa." Am J Trop Med Hyg **84**(4): 608-613.
- NOGUERAS, M. M., N. CARDENOSA, et al. (2006). "SEROLOGICAL EVIDENCE OF INFECTION WITH RICKETTSIA TYPHI AND RICKETTSIA FELIS AMONG THE HUMAN POPULATION OF CATALONIA, IN THE NORTHEAST OF SPAIN." Am J Trop Med Hyg **74**(1): 123-126.
- Oliveira, C. J. F., A. Sa-Nunes, et al. (2011). "Deconstructing Tick Saliva: NON-PROTEIN MOLECULES WITH POTENT IMMUNOMODULATORY PROPERTIES." J. Biol. Chem. **286**(13): 10960-10969.
- Openshaw, J. J., D. L. Swerdlow, et al. (2010). "Rocky Mountain Spotted Fever in the United States, 2000-2007: Interpreting Contemporary Increases in Incidence." Am J Trop Med Hyg **83**(1): 174-182.
- Oteo, J. A., S. Nava, et al. (2014). "Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas." Revista chilena de infectología **31**: 54-65.
- Pacheco, R. C., J. Moraes-Filho, et al. (2011). "Rickettsia monteiroi sp. nov., Infecting the Tick *Amblyomma incisum* in Brazil." Appl. Environ. Microbiol. **77**(15): 5207-5211.
- Parola, P., C. D. Paddock, et al. (2005). "Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts." Clin. Microbiol. Rev. **18**(4): 719-756.
- Raoult, D. and V. Roux (1997). "Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases." Clin. Microbiol. Rev. **10**(4): 694-719.
- Regnery, R. L., C. L. Spruill, et al. (1991). "Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes." J. Bacteriol. **173**(5): 1576-1589.
- Rydkina, E., L. C. Turpin, et al. (2010). "Rickettsia rickettsii Infection of Human Macrovascular and Microvascular Endothelial Cells Reveals Activation of Both Common and Cell Type-Specific Host Response Mechanisms." Infect. Immun. **78**(6): 2599-2606.
- Satta, G., V. Chisu, et al. (2011). "Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted microorganisms in Sardinia, Italy." J. Med. Microbiol. **60**(1): 63-68.
- Schriefer, M. E., J. B. Sacci, Jr, et al. (1994). "Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus." J. Clin. Microbiol. **32**(4): 949-954.
- Schuenke, K. W. and D. H. Walker (1994). "Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for an antigenic 120-kilodalton protein of *Rickettsia conorii*." Infect. Immun. **62**(3): 904-909.

- Scorpio, D., L. Wachtman, et al. (2008). "Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*." J Am Assoc Lab Anim Sci **47**(5): 23-28.
- Silverman, D. J., L. A. Santucci, et al. (1992). "Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin." Infect. Immun. **60**(7): 2733-2740.
- Steinbach, W. J. and A. K. Shetty (2001). "Use of the diagnostic bacteriology laboratory: a practical review for the clinician." Postgrad. Med. J. **77**(905): 148-156.
- Svraka, S., J. Rolain, et al. (2006). "*Rickettsia prowazekii* and real-time polymerase chain reaction." Emerg Infect Dis **12**(3): 428-432.
- Tzianabos, T., B. E. Anderson, et al. (1989). "Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology." J. Clin. Microbiol. **27**(12): 2866-2868.
- Uchiyama, T. (2012). "Tropism and pathogenicity of rickettsiae." Front Microbiol **3**: 230.
- Zavala-Velazquez J. E., Yu X. J., Walker D. H. (1996) "Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico" American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55: 157-159.
- Zavala-Velazquez J. E., Ruiz-Sosa J.A., Sanchez-Elias R. A., Becerra-Carmona G., Walter D.H. (2000) "*Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan" Lancet 356: 1079-1080.
- Zavala-Castro Jorge, Dzul-Rosado Karla, Arias Leon Juan, Walker David, Zavala-Velazquez Jorge (2009) "Short Report: *Rickettsia felis* outer membrane protein A: a potential tool for diagnosis of patients with flea-borne spotted fever" The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Páginas de Internet

CDC. Página principal del Centro para el control de las enfermedades y su prevención (1998). Disponible en:

[Http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/2/pdfs/98-0205.pdf](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/2/pdfs/98-0205.pdf)

CDC. "Morbidity and Mortality weekly report Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: RMSF, Ehrlichioses and Anaplasmosis" (2006). Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5504.pdf>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2010. Disponible en: www.inegi.org.mx

Revista Médica de Chile. 2014 v.132 n.3 Santiago mar. 2004. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0034-98872004000300015

Secretaria de Salud de Baja California. Disponible en: www.saludbc.gob.mx

Servicio Meteorológico Nacional Mexicano 1951-2012. Disponible en:

<http://smn.cna.gob.mx/climatologia/Normales5110/NORMAL02033.TXT>

Declaración de Helsinki (1964-2013) Disponible en:

<http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

ANEXOS

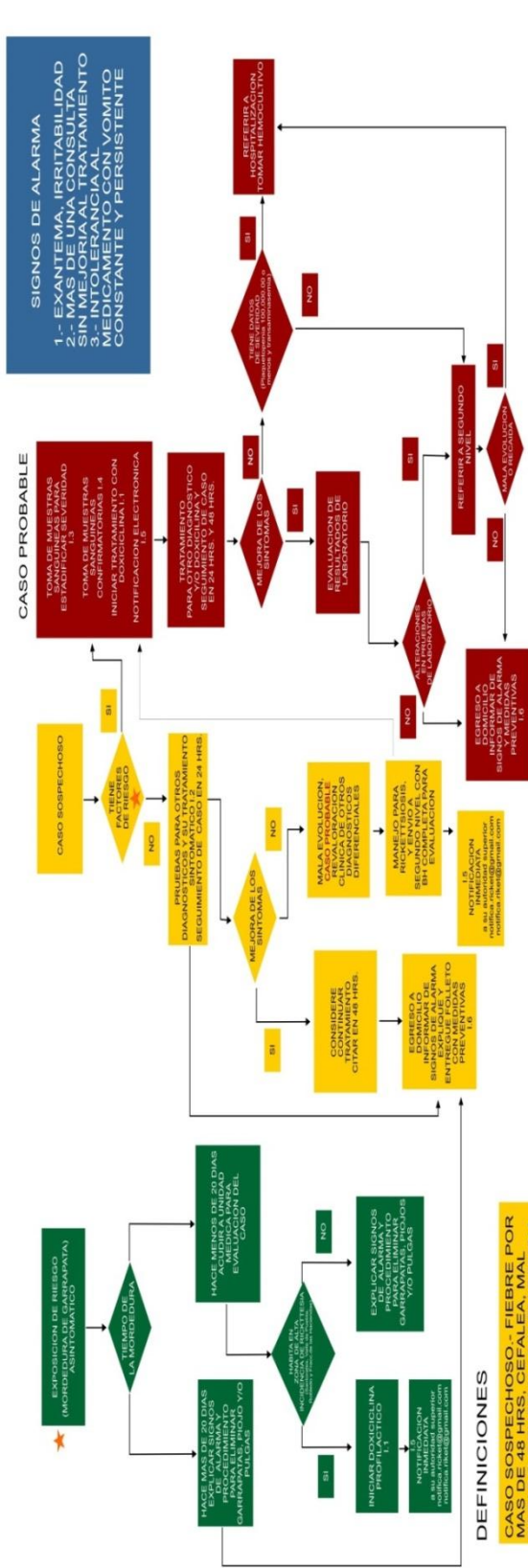


SECTOR SALUD

CUESTIONARIO CLINICO EPIDEMIOLOGICO DE CASO DE PROBABLE RICKETTSIOSIS

I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE.		No. de afiliación o expediente: _____		CAMA: _____		SERVICIO: _____	
Nombre: _____		RFC: _____		CURP: _____			
Apellido paterno _____		Apellido materno _____		Nombre (s) _____			
DATOS DEL NACIMIENTO							
Fecha de nacimiento _____		Estado de nacimiento: _____		Jurisdicción de nacimiento _____			
Municipio de nacimiento: _____		Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>		Edad: Años <input type="text"/> <input type="text"/>		Meses <input type="text"/> <input type="text"/> Dias <input type="text"/> <input type="text"/>	
RESIDENCIA ACTUAL							
Domicilio _____							
Calle y Núm. _____		Colonia o localidad _____		Teléfono (s) _____			
Localidad _____		Municipio _____		Estado _____			
Entre: Calle: _____		Y calle: _____					
*Latitud: _____		*Altitud: _____		(use con Epi-Info 7)			
LUGAR LABORAL y/o ESCUELA							
Escolaridad: _____		Ocupación: _____		Domicilio: _____			
Calle y Núm. _____		Colonia o localidad _____		Teléfono (s) _____			
Localidad _____		Municipio _____		Estado _____			
*Latitud: _____		*Altitud: _____		(*Determinarlas con Epi-Info 7)			
II. DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE							
CLAVE DE LA UNIDAD: _____		Estado _____		Jurisdicción: _____			
Municipio _____		Localidad _____		Institución _____			
UNIDAD O DELEGACIÓN _____							
FECHA DE SOLICITUD DE ATENCIÓN MEDICA EN LA UNIDAD NOTIFICANTE _____				FECHA DE NOTIFICACION AL ESTADO _____			
FECHA DE INICIO DE ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO _____				FECHA DE TERMINACIÓN DEL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO _____			
FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA DGE _____				FECHA DE PRIMER CONTACTO CON LOS SERVICIOS DE SALUD _____			
DIAGNOSTICO PROBABLE: _____				DIAGNOSTICO FINAL: _____			
III. DATOS EPIDEMIOLOGICOS							
PROCEDENCIA: Local <input type="checkbox"/>		Importado <input type="checkbox"/>					
HA VISITADO OTROS LUGARES: _____		EN LAS ULTIMAS TRES SEMANAS: NO <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/>					
DOMICILIOS VISITADOS: _____		País: _____		Estado: _____		Municipio: _____	
Localidad: _____		CONTACTO CON: ROEDORES <input type="checkbox"/>		PIOJOS DEL CUERPO HUMANO <input type="checkbox"/>		PERROS o/GARRAPATAS <input type="checkbox"/>	
OTRO: _____		SI FUE MORDIDO POR GARRAPATA, LA EVIDENCIA FUE: LA GARRAPATA <input type="checkbox"/>		LESIÓN DE LA MORDEDURA <input type="checkbox"/>		Tiempo transcurrido desde la mordedura: >20 días <input type="checkbox"/>	
Fecha de la Mordedura: _____		Tiempo que duró adherida la garrapata al cuerpo: >8 hrs <input type="checkbox"/>		Desconoce <input type="checkbox"/>		<20 días <input type="checkbox"/>	
<8 hrs <input type="checkbox"/>		EXISTEN ENFERMOS SIMILARES EN LA LOCALIDAD: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>					
ANTECEDENTES DE MUERTES INUSUALES DE ANIMALES SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		PERROS <input type="checkbox"/>		ROEDORES <input type="checkbox"/>		AVES <input type="checkbox"/>	
OTRO: _____							
IV. CUADRO CLÍNICO (Si = 1, No = 2, Ignorados = 0)				TEMPERATURA DE INGRESO TEM _____ ° C TEMP _____ ° C			
Fecha de inicio de cada signo y síntoma:							
FECHA		Fotofobia		DIA MES AÑO			
Fiebre <input type="checkbox"/>		Dolor abdominal		Convulsiones <input type="checkbox"/>		*Fecha de inicio: _____	
TEMP _____ C		Conjuntivitis		Ataxia <input type="checkbox"/>		Localización de inicio: _____	
Cefalea <input type="checkbox"/>		Diarrea		Melena <input type="checkbox"/>		Características: _____	
Mialgias <input type="checkbox"/>		Tos		Papiledema <input type="checkbox"/>		Otros datos Clínicos: _____	
Artralgias <input type="checkbox"/>		Rinorrea		Edema <input type="checkbox"/>			
Anorexia <input type="checkbox"/>		Dolor faringeo		Hematemesis <input type="checkbox"/>			
Debilidad muscular <input type="checkbox"/>		Ictericia		Petequias <input type="checkbox"/>			
Vómito <input type="checkbox"/>		Rigidez de cuello		Equimiosis <input type="checkbox"/>			
Náuseas <input type="checkbox"/>		Confusión		OTRO DX. o Comorbilidad: _____			
Malestar General <input type="checkbox"/>		Hepato/esplenomega					
DIA MES AÑO		DIA MES AÑO		DIA MES AÑO		DIA MES AÑO	
FUE HOSPITALIZADO: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		FECHAS: INGRESO _____		EGRESO _____			
DIA MES AÑO		DIA MES AÑO		DIA MES AÑO			
*A cuantas consultas acudio previamente a la sospecha medica de Rickettsia: _____							
DIAGNOSTICOS REFERIDOS DE CONSULTAS PREVIAS Y TRATAMIENTOS: _____							

RUTA CRITICA PARA DIAGNOSTICO Y MANEJO DE RICKETTSIOSIS



DEFINICIONES

- CASO SOSPECHOSO:** FIEBRE POR MAS DE 48 HRS, CEFALEA, MAL ESTADO GENERAL, SIN EVIDENCIA DE OTRA ENFERMEDAD QUE LO EXPLIQUE.
- CASO PROBABLE:** UN CASO SOSPECHOSO MAS CUADRO DE LAS CONDICIONES SIGUIENTES: DOLOR ABDOMINAL, ODINOFAGIA, ALERGIAS, ERUPCIONES, GOMOS, O ICTERICIA.
- CON MALA RESPUESTA A TRATAMIENTO:** PARA OTROS DIAGNOSTICOS Y/O CASO SOSPECHOSO CON FACTOR DE RIESGO.
- BIOMETRIA HEMATICA CON MONOCITOSIS, NEUTROFILIA, LINFOPENIA Y/O PLASMOLEPTENIA Y/O FUNCION HEPATICA.**
- EN MENORES DE 5 AÑOS, EN PUEDE CURSAR CON LLANTO, IRRITABILIDAD O DECANIMIENTO.**
- FACTORES DE RIESGO:** EN LOS ULTIMOS VEINTE DIAS MORDEDURA DE GARRAPATA, CONTACTO CON VISITAS A AREAS INFESTADAS, Y/O (GATOS, PERROS, ROEDORES), Y/O (PIOJO DEL CUERPO, PULGAS).
- CASO CONFIRMADO:** CUADRO CLINICO MAS ALGUNA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO: Rickettsia MAYOR A 1:64 IgM y PCR para Rickettsia Rickettsii.

- ## INSTRUCCIONES PARA FLUJOGRAMA RICKETTSIOSIS
- I.1 Tratamiento post exposición a mordedura de garrapata y sin síntomas.** Niños menores de 40 kg de peso indicar DOXICICLINA VIA ORAL 2.5 mg por kg de peso por dosis cada 12 horas durante 5 días. Adultos o niños mayores a 40 kg de peso indicar DOXICICLINA 100 mg VIA ORAL cada 12 horas durante 5 días.
 - I.2 Tratamiento para síntomas en los casos sospechosos con fiebre sin dolor abdominal.** Niños: PARACETAMOL VIA ORAL 10 a 15 mg por kg de peso por dosis cada 6 horas durante 24 hrs. Sin pasar de 500 mg por dosis. Adultos: METAMIZOL SODICO (DIPIRONA) VIA ORAL 10 mg por kg de peso por dosis cada 6 horas durante 24 hrs. Sin pasar de 500 mg por dosis. Adultos: PARACETAMOL VIA ORAL 500 mg a 1 gramo cada 6 h durante 24 h. METAMIZOL SODICO (DIPIRONA) VIA ORAL 500 mg a 1 gramo cada 6 horas durante 24 h. Antibioterapia para diagnóstico sospechado (Reforzar vigilancia en caso de presentarse rash aparentemente asociado a antibiótico).
 - I.3 Muestras sanguíneas estadificar severidad en 2 tubos simultáneamente.** 1 tubo con anticoagulante EDTA tapa morada. Biometría hemática completa con conteo de plaquetas. Aminotransferasas (TGO, TGP, GGT) DHL (Lactato deshidrogenasa) CPK (Creatin fosfoquinasa)
 - I.4 Muestras sanguíneas para pruebas confirmatorias (Laboratorio Estatal de Salud Pública).** Para detección por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR-Rickettsia) en un tubo con anticoagulante, tapón azul (Citrato de Sodio) y/o Tubo EDTA con tapón morado. Para detección de IgG específica para Rickettsia por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI-Rickettsia-IgG) en un tubo sin anticoagulante.
 - I.5 Notificación inmediata.** Enviar correo electrónico a los correos rickett@ gmail.com y notifica_rickett@ gmail.com, Debe de incluir la siguiente información, Unidad que reporta, Sexo, Nombre del paciente, Edad, Domicilio, Teléfono del paciente, Fecha de mordedura y fecha de notificación.
 - I.6 Procedimiento para eliminar vectores.** Contactar a compañía de fumigación.