

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE  
AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *RICKETTSIA RICKETTSII* EN  
GARRAPATAS (IXODIDAE) OBTENIDAS EN PERROS DE  
ENTIDADES DEL SUR DEL ESTADO DE COAHUILA, MÉXICO.**

**PRESENTADA POR  
ADRIANA GRACIELA ESPINOSA GONZÁLEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**JUNIO 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE  
AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *RICKETTSIA RICKETTSII* EN  
GARRAPATAS (IXODIDAE) OBTENIDAS EN PERROS DE  
ENTIDADES DEL SUR DEL ESTADO DE COAHUILA, MÉXICO.**

**PRESENTADA POR**

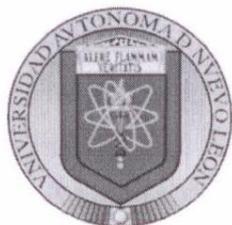
**MVZ. ADRIANA GRACIELA ESPINOSA GONZÁLEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**ESCOBEDO, NUEVO LEÓN,**

**JUNIO 2016**

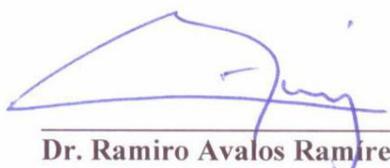
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

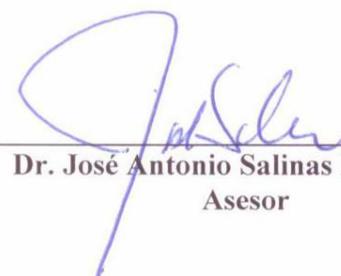


Aprobación de tesis por el comité particular de  
**MVZ. Adriana Graciela Espinosa González**

**COMISION DE TESIS:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño**  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ramiro Avalos Ramírez**  
Co-Director

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Antonio Salinas Meléndez**  
Asesor

\_\_\_\_\_  
**Asesor externo Dra. María D. Esteve-Gassent**  
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences  
Texas A&M University

ESCOBEDO, N. L. MEXICO

JUNIO 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

*Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que con su apoyo emocional, intelectual y económico, han hecho posible la realización de esta tesis de posgrado, cumpliendo así uno de los objetivos más importantes para mí:*

- A mis padres, que me enseñaron el valor de la responsabilidad, la constancia y la importancia del saber.*
- A Cesar Dávila, por su comprensión, su afecto y apoyo incondicional.*
- A mi director de tesis, Jesús Jaime Hernández Escareño, quien con su inteligencia y su experiencia me ha orientado en su realización.*
- Al Dr Ramiro Ávalos Ramírez por todo su apoyo en la realización y revisión de esta tesis.*
- A mi amiga y maestra Stephany Castillo, por sus continuas y esclarecedoras orientaciones respecto a los procedimientos realizados en el laboratorio.*
- A los Equipos Directivos, Profesores y Alumnos de la facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, por la positiva acogida a esta investigación y valiosa colaboración en su realización.*
- A CONACYT, por la concesión de una beca de investigación, que hizo posible mi total dedicación a la realización del presente trabajo.*

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>12</b>
<b>1.1.- Justificación</b>	<b>14</b>
<b>1.2.-Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>1.3.- Objetivo General</b>	<b>16</b>
<b>1.4.- Objetivos Específicos</b>	<b>16</b>
<b>2.- ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
2.1.- Historia de las Rickettsias	17
2.1.1.- Fiebre Manchada	22
2.2.- Características clínicas de la Fiebre Manchada (FM)	27
2.3.- Agente etiológico: <i>Rickettsia rickettsii</i>	32
2.3.1.- Filogenia, taxonomía y Morfología	32
2.3.2.- Ciclo de vida	34
2.4.- Epidemiología de la FM y <i>Rickettsia rickettsii</i>	36
2.4.1.- Patogenia	37

2.4.2.- Reservorios naturales y modo de transmisión	39
2.5.- Situación en México	41
2.6.- Detección molecular de <i>Rickettsia rickettsii</i>	43
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1.- Localización y características geográficas de los municipios muestreados	46
3.2.- Área de Trabajo	50
3.3.- Diseño Experimental	51
3.4.- Obtención de Muestras	51
3.5.- Encuesta de Manejo e Higiene	53
3.6.- Extracción de ADN	53
3.7.- Amplificación de ADN	56
3.7.1.- Estandarización de la PCR	56
3.7.2.- PCR	57
3.8.- Electroforesis en gel de Agarosa	58
3.9.- Secuenciación	59
<b>4.- RESULTADOS</b>	<b>60</b>
4.1.- Garrapatas muestreadas	60
4.2.- Extracción de ADN	60
4.3.- Estandarización de la PCR	61
4.4.- Amplificación por PCR	62
4.5.- Cuestionario	64

4.6.- Secuenciación	69
<b>5.- DISCUSIÓN</b>	<b>70</b>
<b>6.- CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>7.- LITERATURA CITADA</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lesión cutánea característica de <i>Rickettsia rickettsii</i> presente principalmente en extremidades y pecho del paciente	29
<b>Figura 2.</b> Edema pulmonar severo debido a la permeabilidad vascular que ocasiona <i>R. rickettsii</i>	30
<b>Figura 3.</b> Diagrama de Infección de <i>Rickettsia rickettsii</i> Invadiendo una célula	39
<b>Figura 4.</b> Ciclo de transmisión de <i>Rickettsia rickettsii</i>	41
<b>Figura 5.</b> Mapa de México mostrando el periodo y la región donde fueron reportados casos humanos de <i>Rickettsia rickettsii</i>	43
<b>Figura 6.</b> Reacción en cadena de la polimerasa: PCR	44
<b>Figura 7.</b> Mapa de Coahuila con acercamiento a las tres ciudades donde se realizó el muestreo	45
<b>Figura 8.</b> Laboratorios de genética, virología y microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	50
<b>Figura 9.</b> Espectrofotómetro Epoch Microplate	56

<b>Figura 10.</b> Garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i> observada bajo el Estereoscopio	60
<b>Figura 11.</b> ADN de muestras de garrapatas de San Pedro con el método de fenol-cloroformo	61
<b>Figura 12.</b> ADN de muestras de garrapatas de Saltillo con el método de fenol-cloroformo	61
<b>Figura 13.</b> ADN de muestras de garrapatas de Parras con el método de fenol-cloroformo	61
<b>Figura 14.</b> Gradiente de estandarización de la PCR para <i>R. rickettsii</i>	62
<b>Figura 15.</b> Amplificación de ADN de <i>R. rickettsii</i> del Municipio de San Pedro	62
<b>Figura 16.</b> Figura 16. Amplificación del ADN de <i>R. rickettsii</i> de la Ciudad de Saltillo	62
<b>Figura 17.</b> Amplificación del ADN de <i>R. rickettsii</i> de las garrapatas de Parras	63
<b>Figura 18.</b> Gráfica de perros muestreados positivos y negativos que habitaban en interior y exterior de la casa	66
<b>Figura 19.</b> Gráfica de animales con y sin acceso a la calle que resultaron positivos y negativos a <i>R. rickettsii</i>	67

<b>Figura 20.</b> Gráfica de perros positivos y negativos a <i>R. rickettsii</i> que tenían una convivencia cercana con sus dueños	68
<b>Figura 21.</b> Gráfica del número de animales muestreados con garrapatas tanto positivas como negativas a la <i>Rickettsia</i> que eran desparasitados de manera externa (baños con asuntol e inyección de ivermectina) por sus dueños, y los que no recibían desparasitación externa	69
<b>Figura 22.</b> Resultado de la secuenciación de ADN perteneciente a <i>Rickettsia rickettsii</i> cepa Morgan	69

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de los perros muestreados para obtener garrapatas acorde al municipio y comunidad del estado de Coahuila.....	53
<b>Tabla 2.</b> Programa para la PCR gradiente.....	57
<b>Tabla 3.</b> Primers utilizados para la amplificación de ADN de <i>Rickettsia rickettsii</i> .....	58
<b>Tabla 4.</b> Componentes y concentraciones que conformaron la mezcla para PCR.....	59
<b>Tabla 5.</b> Programa para la PCR.....	59
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de positividad de las muestras colectadas en las ciudades estudiadas de Coahuila.....	64
<b>Tabla 7.</b> Cuestionario de factores de riesgo.....	65
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de propietarios que tienen un trato cercano con las mascotas.....	66

## RESUMEN

La Fiebre manchada de las Montañas Rocosas, causada por *Rickettsia rickettsii*, es una enfermedad transmitida por garrapatas y potencialmente fatal que se extiende desde Norteamérica hasta Argentina. Su vector más importante en México son las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* las cuales se alimentan principalmente del perro. En los últimos años se han reportado numerosos casos de infección por esta bacteria en humanos del estado de Coahuila. La mayoría de los brotes febriles se han presentado en el sur del estado por lo que en el presente estudio fue enfocado en regiones selectas de esta área. El objetivo de esta investigación fue demostrar la presencia de secuencias genéticas de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas de perros ubicados en localidades selectas de cuatro municipios de Coahuila (San Pedro de las Colonias, Saltillo, General Cepeda y Parras de la Fuente) mediante la técnica de PCR y secuenciación. Además se analizaron ciertos los factores de riesgo para la presencia de la bacteria en el área estudiada. Se muestrearon 60 perros por ciudad, las garrapatas recuperadas fueron colocadas en alcohol al 70% y posteriormente identificadas. Se realizó una encuesta a los propietarios de las mascotas para determinar los factores de riesgo presentes en las áreas de estudio. La identificación de las garrapatas fue *R. sanguineus*. De las muestras analizadas por PCR el total de garrapatas positivas a *R. rickettsii* fueron; San Pedro 39 que corresponde al 65%, Saltillo 28, (47%) y Parras 48 (80%). Posteriormente, para confirmar la especie se enviaron a secuenciar los productos amplificados, los cuales dieron positivos a *R. rickettsii* str Morgan. De acuerdo con los resultados de  $\chi^2$  realizado en la encuesta, no se presentó relación entre el cuidado en el manejo de la mascota con que la garrapata del animal resultara positiva a *Rickettsia rickettsii*.

## INTRODUCCION

En Coahuila se han estado reportando infecciones por *R. rickettsii*, algunos de ellos con resultados fatales. También se han reportado casos febriles sospechosos de esta bacteria con una alta incidencia en regiones del sur del estado de Coahuila; incluso, si el tratamiento para la rickettsiosis es muy eficaz, un diagnóstico tardío y la similitud de su sintomatología clínica con otras enfermedades febriles, tiene como consecuencia la muerte en pacientes que adquieren el patógeno.

Debido a lo anterior, se propuso determinar, las regiones más afectadas, las especies de garrapatas que afectan a las personas en la comunidad, que el patógeno que está causando los decesos en los pacientes es en efecto *R. rickettsii* y de ser así, las cepas implicadas en la infección.

Para llevar a cabo las determinaciones señaladas, se realizaron colectas de garrapatas de perros en tres ciudades de Coahuila donde se han presentado los casos fatales sospechosos de *Rickettsia* (San Pedro, Saltillo y Parras) y se realizaron cuestionarios a algunos propietarios para tener establecido los posibles factores de riesgo para que la persona adquiriera el patógeno.

Aunque son muchas las especies de garrapatas estudiadas como transmisoras de enfermedades a las personas, y por tanto, que pican a las mismas, sabemos que en México existen dos principales vectores para *R. rickettsii* que son *R. sanguineus* y *Amblyomma americanum* (Fritzen *et al.*, 2011, Field-Cortazares, *et al.*, 2015). Aunque existen estudios sobre *R. rickettsii* en México, más específicamente en los estados de Sonora, Mexicali y Yucatán; aparte de que son pocos, éstos se enfocan más que nada en la prevalencia en

pacientes humanos que en vectores y sus reservorios. Por otra parte estos estudios utilizan como métodos de identificación técnicas serológicas que si bien son bastante específicas, no son muy confiables cuando se trata de enfermedades tempranas (Zavala-Castro *et al.*, 2006, Alvarez y Contreras, 2013, Field-Cortazares *et al.*, 2015).

Mediante este estudio se logró determinar la presencia de *R. rickettsii* en las garrapatas de la especie *R. sanguineus* obtenidas a partir de perros de las 3 localidades del estado de Coahuila (San Pedro, Saltillo y Parras de la Fuente) utilizando la técnica de PCR, la cual es una de las pruebas actualmente usadas para una rápida y efectiva identificación de microorganismos, en este caso de importancia en Salud Publica.

## JUSTIFICACIÓN

En Coahuila se han reportado recientemente infecciones de *R. rickettsii* en pacientes humanos y algunos de ellos con resultados fatales. Por otro lado, se han reportado brotes de enfermedades febriles sospechosos de esta bacteria con una aparente alta incidencia en la región sur del estado. Dada la importancia del tratamiento anti-rickettsiosis y del diagnóstico puntual y específico para evitar fatalidades el presente trabajo fue llevado a cabo para detectar la presencia y circulación de *R. rickettsii*, mediante métodos moleculares (PCR y Secuenciación), en garrapatas obtenidas de perros presentes en zonas endémicas con el propósito de coadyuvar en el establecimiento de medidas de control y prevención de esta infección.

## **HIPÓTESIS**

Dado el carácter endémico de la infección por *R. rickettsii* en el sur de Coahuila es factible que la bacteria está presente en una alta frecuencia en garrapatas de perros de comunidades selectas de esta zona del estado.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detectar y determinar mediante métodos moleculares la frecuencia de *R. rickettsii* en garrapatas (Ixodidae) de perros ubicados en localidades selectas del sur del estado de Coahuila. Así mismo, establecer factores de riesgo selectos asociados a la enfermedad en las áreas de estudio.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Colectar garrapatas a partir de los perros infestados.
- Identificar las garrapatas que actúan como posibles vectores de *R. rickettsii*.
- Extracción de ADN de *R. rickettsii* presente en las garrapatas obtenidas.
- Identificación de cepas de *R. rickettsii* mediante secuenciación
- Realizar la encuesta a las personas responsables de las mascotas

## ANTECEDENTES

### HISTORIA DE LAS RICKETTSIAS

Las rickettsiosis son ampliamente distribuidas en todo el mundo, presentando focos endémicos con brotes esporádicos y, a menudo estacionales, de vez en cuando reemergen en forma epidémica en poblaciones humanas. A lo largo de la historia, las epidemias de tifus transmitido por piojos han causado más muertes que todas las guerras juntas (Weissmann, 2005) y en los últimos años han sido objeto de multitud de estudios por ser los agentes etiológicos de algunas de las enfermedades más viejas y, a la vez, más recientemente conocidas. Por una parte *Rickettsia prowazekii* ha sido y es la causa de una de las plagas (tifus epidémico) que desde tiempos históricos (ej. plaga de Atenas descrita por Tucídides) hasta el momento presente (ej. epidemia de Burundi, con más de 30.000 casos, a finales de la década de los años 90) viene afligiendo a la humanidad (Gray, 1998), sin embargo, por otra parte, parece evidente, de acuerdo con los análisis filogenéticos efectuados, que un antecesor evolutivo de *R. prowazekii* dio lugar a uno de los sucesos más importantes en la evolución de los eucariotas: el origen de las mitocondrias. A tal conclusión se llegó tras la secuenciación del genoma completo de *R. prowazekii* (Anderson *et al.*, 1990).

En el pasado, las rickettsiosis humanas causadas por miembros del género *Rickettsia* fueron llamadas colectivamente "fiebre del tifus" y al principio del siglo 20 incluyen incluso enfermedades no rickettsias como la fiebre tifoidea. Más tarde, las fiebres tifus se

diferenciaron principalmente por una lesión característica (por ejemplo, las erupciones cutáneas del tifus o las máculas oscuras de la fiebre maculosa del Mediterráneo), agente causal, y el vector (por ejemplo, piojo, pulgas, garrapatas, ácaros). A causa de que todos los agentes causan fiebres y erupciones algo similares, la caracterización de los agentes causales resultó en 3 grupos distintos en función de su composición antigénica, generalmente conocida como grupo de la fiebre manchada o tifus de la garrapata (por ejemplo, fiebre de las Montañas Rocosas), grupo de las tifus (fiebre del piojo o epidemia de tifus, tifus endémico o murino), y el grupo de las tifus de las malezas (Kelly, *et al.*, 2002).

**Fiebre tífica o tifus.** El tifus epidémico, es principalmente una infección transmitida por el piojo humano (*Pediculus humanus*) causada por *Rickettsia prowazekii*. La transmisión del agente por el piojo humano fue probado por Nicolle en 1909 (Raoult y Roux, 1999), y en 1916, Da Rocha- Lima demostró que *R. prowazekii* fue el agente etiológico (Kelly, *et al.*, 2002).

La transmisión por lo general se produce por la auto-inoculación de las heces del piojo infectado con rickettsia por el rascado de la zona de la picadura, pero también puede ocurrir por la inhalación de un aerosol que contiene las heces secas. El piojo por lo general muere a causa de la infección. A menudo, el tifus epidémico se produce en climas muy fríos en condiciones de falta de higiene que resulta en infestación por piojos, que son comunes en condiciones de guerra, el hambre y los trastornos sociales. Tales condiciones han llevado de vez en cuando al resurgimiento masivo de tifus epidémico. Los brotes recientes se han producido en las regiones montañosas del Norte y América del Sur, como Perú y México, y en países africanos, entre ellos Argelia, Uganda, Ruanda, Etiopía, Nigeria, Zaire y Burundi (Raoult y Roux, 1999, Perine *et al.*, 1992, Raoult, 1998). ). En Burundi, tras el estallido de la guerra civil en 1993, un millón setecientos sesenta mil refugiados fueron hacinados en

campos de refugiados. A partir de agosto de 1995, se habían notificado tifus epidémico en 76 de 102 pacientes en prisión de Ngozi en el norte de Burundi, y en septiembre de 1997 se habían producido un estimado de 45,000 casos; la mayoría en las regiones más altas, más frías del país (Raoult, 1998). A pesar de que las grandes epidemias de tifus no se han producido en Rusia desde 1940, la agitación política y los grandes cambios en las condiciones sociales han conducido a aumentos en infestaciones de piojos del cuerpo y de un pequeño brote de tifus epidémico en el invierno de 1997 a (Raoult y Roux, 1999, Tarasevich *et al.*, 1998). Esta enfermedad se pretende que sea una de varias enfermedades infecciosas responsables de la hospitalización masiva de las tropas soviéticas durante las acciones militares en Afganistán durante la década de 1980 (Grau y Jorgensen, 2007). El tifus epidémico es conocido por varios nombres, incluyendo "tifus transmitido por el piojo", "fiebre del campamento", "fiebre del barco", "fiebre de la guerra", "fiebre de la cárcel", Fleckfieber (Alemán), exanthematicus tifus (Francés), el tabardillo (Español), y chifusu Hassin (Japonés). Además del típico dolor de cabeza y fiebre que se produce 8-12 días después de la exposición, el tifus epidémico se presenta con una lesión macular generalizada o erupción maculopapular que se extiende desde el tronco hasta los brazos y las piernas. No hay escara asociado con el sitio de la inoculación. Cuando no se trata, el tifus epidémico tiene una tasa de letalidad global del 20%, llegando a porcentajes más altos en las personas de la tercera edad (Winkler, 1976). Una recrudescencia, a veces forma más leve de la enfermedad, llamada enfermedad de Brill-Zinsser, se informó inicialmente a finales de 1890, cuando Brill observó brotes de tifus similar sin la participación del vector. Investigaciones epidemiológicas posteriores de Zinsser sugieren que los humanos infectados de forma crónica fueron el reservorio de *R. prowazekii* y la fuente de nuevas epidemias en poblaciones con piojos hasta 40 años después de su infección inicial (Maxcy,

1926, Zinsser, 1934). Factores como el estrés, otra enfermedad, o la inmunosupresión pueden desencadenar recrudescimiento de la epidemia de tifus. Aunque los seres humanos actúan como el principal reservorio del tifus epidémico, también hay evidencia de que la ardilla voladora y sus ectoparásitos actúan como reservorio en el este de los Estados Unidos y pueden transmitir la enfermedad a los humanos (Reynolds *et al.*, 2003). Por otra parte, el tifus (endémico o de la pulga) murino, causada por la infección accidental con *Rickettsia typhi*, es una de las más frecuentes de las rickettsiosis humanas, a pesar de su ciclo primario es con los roedores, que actúan como reservorios y las pulgas vectoriales (*Xenopsylla cheopis*). El tifus murino tiene una distribución mundial y se presenta en una variedad de entornos, desde caliente y húmedo a semi árida y montañosa, y con frecuencia se encuentra en las ciudades portuarias internacionales y las regiones costeras donde los roedores, son comunes (Paris *et al.*, 2013, Civen y Ngo, 2008). En los últimos años, se ha reportado en los Estados Unidos, Australia, China, Tailandia, Kuwait, Indonesia, Vietnam, y Grecia (Bavaro *et al.*, 2005, Civen y Ngo, 2008). Comparte síntomas con muchas otras enfermedades febriles, incluyendo el tifus epidémico y tifus de las malezas, y con frecuencia se diagnostica erróneamente. Como resultado de ello, la incidencia es, probablemente, muy subestimada (Civen y Ngo, 2008). El tifus murino se diferenció por primera vez del tifus epidémico por Maxcy en 1926 en los Estados Unidos y en el caso del tifus de la maleza o el tifus "rural" por Fletcher en el Instituto para la Investigación Médica de Malasia (Walker, 2015). En contraste con la gravedad de la epidemia de tifus, el tifus murino, a pesar de que requiere hospitalización en el 10% de los casos, es generalmente una enfermedad febril relativamente suave con un período de incubación de 6-10 días seguida de una fiebre de 9-15 días de duración (Bavaro *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2015). La erupción se encuentra principalmente en el tronco y por lo general es menos pronunciada

que la del tifus epidémico. A menudo es complicada, es generalmente auto-limitada, y tiene una tasa de letalidad global del 4% (Xu *et al.*, 2015). La pulga de la rata, el vector principal implicado en la infección humana, no mueren a causa de la infección por rickettsias y sigue siendo infeccioso durante toda la vida. Al igual que el tifus epidémico, la infección humana es causada principalmente por el rascado de la zona de la picadura y auto-inoculación de las heces infectadas con rickettsia, aunque *R. typhi* también puede ser transmitido directamente por la picadura de pulga (Civen y Ngo, 2008). El tifus murino, a veces conocido como "urbano" o el tifus "del almacén", se confunde a menudo clínicamente con el tifus de las malezas, pero por lo general es adquirida en zonas urbanas y carece de la escara patognomónica indicativa de tifus de las malezas (Kelly *et al.*, 2002).

### **Tifus de la garrapata o la fiebre manchada.**

Hasta el año de 1989, sólo 6 rickettsiosis del grupo de la fiebre manchada se habían descrito (Blair *et al.*, 2004). Ahora, al menos 13 enfermedades humanas se reconocen que es causada por las rickettsias del grupo de la fiebre manchada, sólo unos pocos de los cuales están ampliamente distribuidos a causa de su asociación con sus vectores específicos. Los seres humanos son huéspedes accidentales que se infectan por la picadura de garrapatas o ácaros infectados (Kelly *et al.*, 2002).

La fiebre manchada del Mediterráneo es causada por *Rickettsia conorii* y es transmitida por garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. También conocida como "fiebre botonosa", "tifus de garrapata de la India", "fiebre de Marsella," y "tifus de la garrapata de Kenya," la fiebre manchada del Mediterráneo es endémica en el sur de Europa, norte y oeste de África, India, Pakistán, Israel, Rusia, Georgia, y Ucrania (Brouqui *et al.*, 2004). La frecuencia del exantema es casi del 100%, y una lesión cutánea inicial con centro necrótico ("tache noire")

es a menudo presente en el sitio de la picadura de la garrapata. Fiebre maculosa del Mediterráneo severa ha sido reportada en el 6% de los casos, con tasas de mortalidad de hasta el 2,5%, incluyendo los casos tratados con antibióticos (Raoult y Roux, 1997; Rovey *et al.*, 2008).

La fiebre por mordedura de la garrapata de Sudáfrica fue nombrada inicialmente por Nuttall en 1911. El agente, *R. africae*, fue aislado por primera vez en Etiopía de una garrapata *Amblyomma variegatum* (Tsai *et al.*, 2008). La enfermedad ha sido descrita recientemente en pacientes en Zimbabwe (Kelly y Mason, 1990, Fournier *et al.*, 1999), Botswana (Ericsson *et al.*, 2004) el centro de Kenia (Rutherford *et al.*, 2004) y en Sudáfrica (Fournier *et al.*, 1998). Esta rickettsiosis se caracteriza por una lesión patognomónica en el sitio de la picadura de la garrapata y linfadenopatía regional, con frecuencia sin erupción. Por lo general es una enfermedad leve de 3-4 días de duración, a pesar de que existen casos graves con una duración de 10-12 días y, a veces con resultado de muerte (Ericsson *et al.*, 2004; Rutherford *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2008). Tasas muy altas de casos de infecciones por *R. Africae* transmitidas por las garrapatas *Amblyomma* se han reportado en el sur de África (Cear, 1972; Ericsson *et al.*, 2004). El tifus siberiano de la garrapata, causado por *R. sibirica* y se transmite a los humanos por las garrapatas *Dermacentor*, *Hyalomma*, y *Haemaphysalis*, fue descrita por primera vez en 1943 en el centro de Siberia (Solary *et al.*, 2014). Esta enfermedad ha sido reportada en Asia Central, la Unión Soviética, Mongolia, y Pakistán (Rydkina *et al.*, 1999; Lewin *et al.*, 2003; Hay *et al.*, 2016).

Rickettsialpox (*Rickettsia akari*) es la primera rickettsia del grupo de las fiebres manchadas transmitida por ácaros. Es causada por la picadura de ácaros chupadores de sangre infectados (*Dermanyssus sanguineus*) que normalmente se alimentan de una variedad de pequeños mamíferos (Krusell *et al.*, 2002; Mcquiston *et al.*, 2004). Se reportó por primera

vez en la ciudad de Nueva York en 1946 y desde entonces ha sido reportado en Ucrania, Croacia y, más recientemente, en África del Sur (Mcquiston *et al.*, 2004). En Japón, se reportaron varios casos de una enfermedad causada por un agente del grupo de las fiebres manchadas en 1984 con el uso de la reacción de Weil-Felix (Mahara, 1997) y se confirmó por medio de la prueba de inmunoperoxidasa indirecta más específica en 1985, *Rickettsia japonica*, el agente de la fiebre manchada japonesa u oriental, la cual se aisló de un paciente febril con exantema (Suto, 1985). Dos rickettsiosis relativamente suaves del grupo de la fiebre manchada ocurren en Australia: tifus de la garrapata de Queensland, causada por *Rickettsia australis* la cual se reportó por primera vez durante la Segunda Guerra Mundial (McBride *et al.*, 2007), y la fiebre manchada de la isla de Flinders, causada por *Rickettsia honei*. Esta última enfermedad, aunque identificado como un rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en 1991, años antes un médico local la definió como una enfermedad distinta pero más suave. A diferencia del caso del tifus de la garrapata de Queensland, es poco común observar una escara en el caso de la fiebre manchada de la isla de Flinders (Unsworth *et al.*, 2007). También en 1991, un agente similar a *R. conorii* nombrado *R. caspii* fue aislado de un paciente con "enfermedad eruptiva del verano" en Astracán, en el Mar Caspio (Kelly *et al.*, 2002). El agente se piensa que es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus pumilio*. El agente del tifus de la garrapata de israelí, *R. sharonii*, está estrechamente relacionado con *R. conorii*. Este agente se ha asociado recientemente con la enfermedad humana en Portugal y en Sicilia, además de Israel. La enfermedad es generalmente más severa que la fiebre del Mediterráneo y la escara esta frecuentemente ausente. Más recientemente, *R. mongolotimonae*, *R. slovacae*, y *R. helvetica* han sido identificados como causas de rickettsiosis en humanos en Europa. Desde 1996, un agente de rickettsia aislado originalmente de las garrapatas *Hyalomma asiaticum* en Mongolia se

ha detectado en varios pacientes en el sur de Francia (Parola y Raoult, 2001). El agente con el nombre de *R. mongolotimonae* está asociado con garrapatas de la especie *Hyalomma* en el África subsahariana (Raoult y Roux, 1997). En 1996, Raoult y colaboradores informaron sobre una nueva enfermedad febril humana transmitida por una garrapata *Dermacentor marginatus* en las montañas de los Pirineos. El análisis de Western blot indicó reactividad específica para *R. slovacca*, y el agente se aisló de una garrapata adherida a la persona (Sekeyova *et al.*, 1998). En 1999, *R. helvetica*, transmitida por la picadura de garrapatas *Ixodes ricinus*, fue implicada como la causa principal de rickettsiosis humana en el este de Francia. Además, las muestras de suero recogidas de 35 (9.2%) de 379 trabajadores forestales de esa región fueron específicamente reactivos a los antígenos de *R. helvética*. Estos informes sugieren síndromes neurológicos asociados con *R. slovacca* y *R. helvética* (Fournier *et al.*, 2000). *R. amblyommii* ha sido serológicamente implicado como causa de una rickettsiosis del grupo de la fiebre manchada leve (Nunes *et al.*, 2015).

Un agente rickettsioso detectado primero en 1990 en California en pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*) se identificó posteriormente en un paciente en Texas (Schriefer *et al.*, 1994). La rickettsia, que entonces se llamaba el agente ELB, se detectó posteriormente en la sangre de 3 pacientes adicionales de Texas y México mediante el uso de PCR (Raoult *et al.*, 2001). Las pruebas serológicas específicas también mostraron reactividad del agente de suero de pacientes en Francia y Brasil. Aunque el agente del tifus de la pulga de California se consideró inicialmente una rickettsia del grupo de las tifus, la caracterización molecular del agente cuyo nombre es *R. felis* lo coloca en el grupo de las fiebres manchadas (Raoult y Roux, 1997; Pérez-Osorio *et al.*, 2008). Además de las *Rickettsia* del grupo de la fiebre manchada que se describen aquí, muchas cepas o especies aún no se han demostrado ser patógenas para los humanos (Roux *et al.*, 1996).

### **Fiebre manchada de las Montañas Rocosas.**

El doctor Howard Taylor Ricketts identificó el agente etiológico de esta enfermedad entre los años de 1906 a 1910, y llegó a la conclusión de que esta enfermedad es transmisible por animales de laboratorio y por lo tanto es de tipo infeccioso. Gracias a este descubrimiento hubo un marcado progreso en razón del entendimiento de la patogénesis y desarrollo de la enfermedad. Como suele pasar con muchos trabajadores de laboratorios de enfermedades infecciosas el doctor H Taylor adquiere el tifus epidémico en el laboratorio y muere en mayo de 1910.

Las lesiones vasculares características, la morfología de la bacteria intracelular que en ese entonces se denominaba como *Dermacentroxenus rickettsii* y la confirmación de que ésta era transmitida por la garrapata, fueron demostradas por primera vez entre los años de 1916 a 1920 por S Burt Wolback, (De Lara y Cárdenas, 2008). En 1919 se demuestra que la aparición de vasculitis ampliamente diseminada es a causa de la presencia de rickettsias en las células endoteliales (Nickerson y Malik, 2012). La bacteria fue unificada al género *Rickettsia* en honor al doctor H Taylor Ricketts debido a que el término genérico *Dermacentroxenus* no fue universalmente aceptado. Debido a esto, en 1922 Brumpt propone el nombre de *R. rickettsii* (De Lara y Cárdenas, 2008), (Dantas-Torres, 2007).

La FMMR fue reportada al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) por primera vez en 1920 (Nickerson y Ellis, 2012). La primera vacuna efectiva se constituyó a partir del cuerpo de las garrapatas vectores infectadas en 1924, exitosamente creada por Roscoe R Spencer y Ralph R Parker.

Se transmite por la picadura de garrapatas, en Brasil, las garrapatas *Amblyomma cajennense* en las zonas rurales y urbanas cercanas a las fuentes de agua son la característica epidemiológica principal detrás de la rickettsiosis (Szabó, 2013). Las garrapatas *Dermacentor andersoni* y *Dermacentor variabilis* son conocidas como los principales vectores en los EE.UU. mientras que en México los principales vectores son *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma americanum* lo mismo que en centro y Sudamérica (Fritzen, 2011), (Field-Cortazares, 2015). *Rhipicephalus sanguineus*, también conocida como la garrapata marrón del perro es la garrapata más extendida en el planeta (Dantas-Torres, 2010). Es la más grave de las enfermedades por rickettsias del grupo de la fiebre manchada y es la enfermedad fatal más comúnmente transmitida por garrapatas en los Estados Unidos. Las tasas de letalidad anuales para la fiebre manchada han oscilado entre el 2% y el 18% desde que se dispone de cloranfenicol y tetraciclina, durante la década de 1940. Informes recientes indican que las tasas de letalidad anuales para la fiebre manchada disminuyeron durante la década de 1980 y principios de 1990 (Holman *et al.*, 2001). Los factores de riesgo asociados con la muerte incluyen la edad avanzada o que los pacientes que adquieren el patógeno sean muy jóvenes así como la demora o ausencia del tratamiento con antibióticos. Hubo 242 casos de fiebre maculosa de las Montañas Rocosas en los Estados Unidos entre 1981 y 1992, el 4% de los cuales fueron mortales. Sin embargo, en un brote un poco más reciente de Brasil, el 66% de los casos fueron mortales (Lemos *et al.*, 2002). La fiebre manchada de las Montañas Rocosas se ha reportado en Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, y Brasil (Parola *et al.*, 2005). Sólo la mitad de los casos confirmados de fiebre manchada de las Montañas Rocosas tiene la tríada clásica de erupción cutánea, fiebre y dolor de cabeza. El período de incubación es de 2-14 días (media de 7 días), y 20% de los pacientes tienen una pequeña lesión primaria en el

sitio de la picadura de la garrapata (Holman *et al.*, 2001), (Openshaw *et al.*, 2010). Esta enfermedad se caracteriza por fiebre, malestar general, dolor de cabeza, mialgia, erupción cutánea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. La erupción, que aparece en aproximadamente el día 3 de la enfermedad, se caracteriza por ser de color rosa y maculopapular, que aparece en los antebrazos, las palmas de las manos, plantas de los pies y las piernas.

### **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA FIEBRE MANCHADA DE LAS MONTAÑAS ROCOSAS (FMMR) O FIEBRE MANCHADA (FM)**

Es un complejo clínico epidemiológico de enfermedades causadas por especies de rickettsias relacionadas por filogenia genética. Los pacientes afectados desarrollan diversos rangos de manifestaciones sistémicas, cutáneas, cardíacas, pulmonares, gastrointestinales, renales, neurológicas, oculares y musculoesqueléticas (ver más adelante). De los pacientes afectados del 72 a 86% son hospitalizados. Los signos clínicos son poco específicos al inicio de la enfermedad. Tiene un periodo de incubación que va de dos a 14 días (media: siete días). Suele ser letal en pacientes no tratados o en mayores de 60 años, por lo general en la segunda semana (intervalo de cinco días entre el inicio de la enfermedad y el tratamiento). En Estados Unidos el rango de mortalidad es de 5 a 10% (Dantas-Torres, 2007), (Piranda *et al.*, 2008).

**Manifestaciones sistémicas:** los primeros días (tres días), la tríada clínica clásica de fiebre, cefalea y exantema se observa solamente en 3% de los casos. Los síntomas iniciales usualmente consisten en: fiebre, escalofríos, malestar general, anorexia, mialgias y cefalea. Los pacientes describen la cefalea como la más intensa que puedan recordar. El 100% de

los casos presentan fiebres mayores a los 40 °C. Signos y síntomas que afectan los órganos gastrointestinales como son náuseas y vómitos, pueden predominar en los primeros días de la enfermedad; también se observa linfadenopatía y esplenomegalia. Frecuentemente hay presencia de edema, la forma periorbital se observa particularmente en niños. Este edema se correlaciona con niveles séricos elevados de albúmina, lo que indica la presencia de enfermedad severa (Warner y Marsh, 2002).

**Manifestaciones cutáneas:** Rash o exantema es el signo clínico más característico de la FMMR (figura 1); sin embargo, su presencia no debe ser considerada para dar el diagnóstico ya que no siempre está presente en los pacientes enfermos; 14% de los pacientes manifiestan exantema durante el primer día de la infección y solamente 49% lo desarrollarán al tercer día. Por lo general, el exantema es macular al comienzo, de 1 a 5 mm de diámetro, evolucionando posteriormente a papular y petequeial o papulovesiculoso. La aparición en el área palmoplantar suele ser tardía. Generalmente, la forma inicial de la lesión comienza con pequeñas máculas eritematosas en las áreas de los tobillos y muñecas, algunas veces en el tórax (10% de los casos) o de manera difusa (10% de los casos); 20% de los pacientes la desarrollarán a partir del día cinco. La mácula es una zona de vasodilatación y eritema, cuyo centro contiene los focos infecciosos de los vasos sanguíneos. Al final de la primera semana, en más de 50% de los casos, la erupción involucra la dermis por edema perivascular y comienza la aparición de lesiones maculopapulosas con petequias centrales. Estas lesiones pueden aclararse o aparecer como zonas equimóticas o purpúricas y rara vez producen urticaria o prurito. De 36 a 82% de los pacientes presentarán el exantema en las palmas y plantas en 8% de los casos se observa ictericia y regularmente indican lesión complicada. Otros signos manifestados de forma

cutánea incluyen úlceras mucosas e hiperpigmentación postinflamatoria. Esto puede resultar en necrosis de la piel y gangrena debido al daño continuo que padecen los tejidos, requiriendo de amputación en casos severos (Warner y Marsh, 2002).



**Figura 1.** Lesión cutánea característica de *Rickettsia rickettsii* presente principalmente en extremidades y pecho del paciente.

**Manifestaciones cardiacas:** miocarditis solo está presente en la minoría de los casos; sin embargo, anormalidades electrocardiográficas consecuentes con este diagnóstico se observan frecuentemente. En estudios ecocardiográficos se observa que la contractibilidad miocárdica se encuentra disminuida; sin embargo, del lado ventricular es normal o bien, la función está moderadamente disminuida. La hipotensión que se observa frecuentemente se debe a hipovolemia (Warner y Marsh, 2002).

**Manifestaciones pulmonares:** este tipo de signos o síntomas se deben a la permeabilidad vascular de la microcirculación pulmonar. Puede observarse rickettsias en el septo alveolar y en las paredes del endotelio vascular pulmonar. La severidad de los signos y síntomas va

a depender de la severidad de la enfermedad. Una tercera parte de los pacientes presenta tos. La telerradiografía de tórax generalmente es normal, pero en proyecciones subsecuentes se observan, de forma dispersa, infiltrados difusos alveolares o intersticiales. Ocasionalmente se observa aumento de la silueta cardiaca con edema pulmonar (figura 2) (Warner y Marsh, 2002).



**Figura 2.** Edema pulmonar severo

**Manifestaciones gastrointestinales:** hay síntomas de náusea y vómito durante los primeros días de presentada la enfermedad (30 a 60% de los casos), dolor abdominal (16 a 52%) y diarrea (1 a 32%). En todos los casos fatales se observa en la necropsia de y durante el examen físico hepatomegalia en 12 a 25% de los pacientes. Otra lesión que se puede observar en los casos fatales de FMMR son las lesiones pancreáticas se (Warner y Marsh, 2002).

**Manifestaciones renales:** Puede desarrollarse insuficiencia renal aguda en los casos severos. En cambio en las infecciones moderadas, puede existir discreta elevación de los

niveles séricos de nitrógeno ureico. Algo que sucede con menor frecuencia, pero que resulta más problemático, es el desarrollo ocasional de necrosis aguda tubular, la cual puede ser inducida por hipotensión persistente (Warner y Marsh, 2002).

**Manifestaciones neurológicas:** La cefalea severa es el mayor síntoma temprano. Aproximadamente 40% de los casos, los pacientes pueden desarrollar letargo, fotofobia, meningismo, amnesia, así como conductas bizarras sugestivas de trastornos psiquiátricos. Ocasionalmente, las manifestaciones neurológicas pueden progresar hacia ataxia, neuropatía sensorial, parálisis de nervios craneales, paraparesias, confusión, alucinaciones, delirio, estupor o coma. Los hallazgos neurológicos preceden al desarrollo del exantema. No hay cambio ni anormalidades en las características del líquido cefalorraquídeo; sin embargo, en una tercera parte de los casos puede contener leucocitos, en otra tercera parte elevación de los niveles de proteínas y en 8% existe disminución en los niveles de glucosa (Warner y Marsh, 2002).

**Manifestaciones oculares:** Existe presencia de retinitis, vasculitis de la retina, neuropatía óptica o de cualquier otra condición inflamatoria intraocular en pacientes con fiebre o exantema, que viven o retornan de lugares endémicos, especialmente durante la primavera o verano, esto sugiere fuertemente un diagnóstico de rickettsiosis. En estos casos, el examen sistémico de fondo de ojo, complementado con angiografía fluorescente pueden ayudar a establecer el diagnóstico de rickettsiosis mientras se obtiene el resultado de los exámenes serológicos. Se presenta conjuntivitis en 30% de los casos. Las manifestaciones oculares incluyen conjuntivitis, edema del nervio óptico, oclusión arterial, engrosamiento

de la vena retinal, hemorragia retinal y desprendimiento de la retina (Warner y Marsh, 2002, Hanen *et al.*, 2014).

**Manifestaciones musculoesqueléticas:** las mialgias son frecuentes. En los casos más severos existe elevación de creatincinasa. Se observa Trombosis y vasculitis mediante examen histopatológico (Warner y Marsh, 2002). Desde el punto de vista de laboratorio se presenta anemia y plaquetopenia, la cual suele ser frecuente, sobre todo en casos graves. Otras alteraciones incluyen: hiponatremia, elevación de deshidrogenasa láctica, creatinofosfocinasa y transaminasas. Puede presentarse coagulación intravascular diseminada, pero esto en raras ocasiones (Bernabeu y Segura, 2005, Hidalgo *et al.*, 2007).

#### **AGENTE ETIOLÓGICO: *RICKETTSIA RICKETTSII***

##### **Filogenia, taxonomía y Morfología:**

La subdivisión alfa de las proteobacterias contiene gran número de géneros de patógenos como pueden ser plantas, patógenos humanos e insectos endosimbioses. Sus estilos de vida representan un amplio espectro que contempla parásitos pericelulares de plantas, patógenos humanos intracelulares facultativos, patógenos humanos intracelulares obligados y plantas e insectos simbioses. El género *Rickettsia* está conformado por diferentes especies pequeñas (0.2-0.5  $\mu\text{m}$  por 0.3-2.0  $\mu\text{m}$ ), pleomórficas (que pueden aparecer como cocos, bacilos o cocobacilos) de bacterias Gram negativas y se enmarca dentro de la familia Rickettsiaceae (dentro de las que también se incluye a *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Bartonella*). Las rickettsias han sido clasificadas en cinco grupos: 1) Grupo de las fiebres papulosas (*R. rickettsii*, *R.*

*conorii* y *R. akari*; 2) Grupo tifus (*R. prowazekii* y *R. typhi*); 3) Tifus cepillo (*R. tsutsugamushi*); 4) Fiebre Q (*Coxiella*); y 5) Neorickettsiosis. Todas las especies son ampliamente distribuidas de manera global, y sus características en común son las siguientes: a) son parásitos intracelulares obligados (se desarrollan estrictamente en células eucarióticas), b) amplia distribución geográfica (algunas especies se mantienen en la naturaleza y son transmitidas a hospederos vertebrados por medio de vectores artrópodos), c) corta viabilidad fuera de los reservorios y vectores que infectan, y d) dificultad para ser cultivadas en el laboratorio en medios líquidos (requieren de la utilización de células huésped vivas, como son modelos animales, huevos embrionados) o bien de cultivos celulares. Presentan ambas genomas: ADN y ARN (Perlman *et al.*, 2006). El tamaño de su genoma es aproximadamente un tercio del tamaño del ADN de *E. coli* y es más pequeño que el de las bacterias de forma libre. Este microorganismo puede desarrollarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula; aquéllas del grupo tifus presentan un crecimiento intracitoplasmático, y las pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas realizan su crecimiento dentro del núcleo. Este crecimiento se favorece con sulfonamidas y se inhibe con tetraciclinas y cloranfenicol. Su ciclo vital salvaje consiste en infectar diferentes hospederos (en general, mamíferos) y vectores (en general garrapatas y pulgas). Su multiplicación es por fisión binaria. La composición de la pared celular y de lipopolisacáridos es similar a la observada en las bacterias Gram negativas. Estos lipopolisacáridos reaccionan de manera cruzada con otras rickettsias que no pertenecen al grupo de las fiebres manchadas, así como con otros organismos Gram negativos (por ejemplo *Proteus* y *Legionella*). En modelos animales, los anticuerpos dirigidos contra estos lipopolisacáridos no protegen contra infecciones subsecuentes. El mayor componente de inmunidad parece estar mediado por los linfocitos T. El ataque se activa por óxido nítrico,

el cual es sintetizado en respuesta a la estimulación por interferón- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Histológicamente, esto se demuestra mediante la respuesta del hospedador, la cual involucra primeramente células inflamatorias mononucleares. *R. rickettsii* tiene dos proteínas de superficie de membrana inmunodominantes externa de aproximadamente 190 kDa denominada proteína OmpA rickettsial externa y de 135 kDa denominada proteína externa OmpB. OmpB es la proteína más abundante. Tanto OmpA y OmpB contienen epítopes especie-específicos, que proveen las bases para la serotipificación de las rickettsias con la utilización de ensayos microinmunofluorescentes indirectos. Datos obtenidos del genoma de la rickettsia han permitido comprender su mecanismo de patogenicidad. Esto podría ayudar en el desarrollo de vacunas y de nuevas herramientas diagnósticas. Su antigenicidad se debe a ciertos lipopolisacáridos de la pared celular, lo que explica la reacción cruzada entre las rickettsias, fiebres papulosas y *Proteus* OX2. Con excepción de *R. prowazekii*, el ser humano constituye tan sólo un huésped accidental. Tiene una marcada importancia clínica debido a su elevada prevalencia en diversas y numerosas áreas geográficas así como a su elevada morbilidad (Ramal *et al.*, 2007), (Dantas-Torres, 2007), (Bernabeu y Segura, 2005), (Moreno, 1998), (Weinert *et al.*, 2009).

### **3.2. Ciclo de vida:**

El ciclo de vida de la bacteria involucra dos tipos de hospederos (hospederos vertebrados e invertebrados). *R. rickettsii* mantiene su infección en garrapatas mediante la transmisión transovarial (rango 30-100%) y transtadial; ésta también puede establecerse en nuevas líneas de garrapatas al alimentarse de hospederos infectados. Los huevos infectados con *R. rickettsii* de las garrapatas hembras desarrollarán larvas infectadas. Las larvas infectadas se

alimentan de roedores pequeños a los cuales infectarán con las rickettsias presentes en su saliva. Larvas no infectadas nacidas de huevos sanos, pueden alimentarse en un animal infectado y, dependiendo de la magnitud y duración de la rickettsemia del hospedero infectado, la larva no infectada puede ingerir suficientes *R. rickettsii* en el sustento sanguíneo y es entonces cuando comienza la infección. Las células afectadas inicialmente son las células epiteliales del estómago superior de la garrapata, esta infección no causa daño aparente a la garrapata hospedera, entrando en el torrente circulatorio, y de ahí invade y se multiplica en otros tejidos de la garrapata, incluyendo glándulas salivales y ovarios. Al momento de la infección generalizada, todos los tejidos de la garrapata pueden estar infectados con *R. rickettsii*; esto ocurre entre los siete a 10 días después de la infección. Las larvas infectadas evolucionan a ninfas infectadas, las cuales, al alimentarse, pueden infectar animales de tamaño mediano. Estas ninfas infectadas, evolucionarán, resultando en garrapatas adultas que pueden infectar animales mayores. Adultos y ninfas no infectadas pueden comenzar a infectarse con *R. rickettsii* al alimentarse frecuentemente de animales con ninfas o adultos infectados. Las garrapatas hembras infectadas pasan *R. rickettsii* de manera transovarial cuando depositan sus huevos, y la siguiente generación de garrapatas podrá transmitir la infección. Aparentemente *R. rickettsii* no se transmite de forma eficaz a garrapatas hembras por esperma masculino durante su apareamiento (Burgdorfer *et al.*, 1966), (Chapman, 2006) (Thorner *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha comprobado que la oportunidad para que una garrapata adquiera la infección se limita a un corto periodo de tiempo (tres a cuatro días). El nivel de rickettsemia depende de la capacidad de la bacteria para invadir el epitelio gástrico. Estudios anteriores indican que muchos géneros y especies de garrapatas están involucradas en la transmisión de *R. rickettsii* (Burgdorfer *et al.*, 1966), (Azad y Beard, 1998).

## **EPIDEMIOLOGÍA DE LA FMMR Y *RICKETTSIA RICKETTSII***

Se presume que hace 250 millones de años (durante las eras Paleozoica tardía o Mesozoica temprana) las garrapatas evolucionaron en formas parasitarias de ancestros de forma libre a la par con el desarrollo de los reptiles los cuales fueron los primeros vertebrados totalmente terrestres. Muchas especies de garrapatas son resistentes al frío y la inanición, viven de dos a cinco años, y poseen un alto potencial reproductivo, así como un amplio rango de hospederos vertebrados. La distribución geográfica de la FMMR está restringida a los países del Hemisferio Occidental como ocurre en Estados Unidos, Oeste de Canadá, Occidente y Centro de México, Panamá y Costa Rica, Noroeste de Argentina, Brasil y Colombia. Esta enfermedad se presenta con más frecuencia en los niños entre los cinco y nueve años de edad. Se trata de un padecimiento estacional, que se presenta con más frecuencia en los meses de más calor (Ramal *et al.*, 2007, Dantas-Torres, 2007, Guedes *et al.*, 2005). Se ha observado, que el hombre tiene mayor posibilidad de adquirir la infección que la mujer, esto debido a que el hombre está más frecuentemente en contacto con el vector que la mujer. La mayor incidencia ha sido observada en niños menores de 10 años (picos en los grupos de 5-9 años) y en adultos entre 40 a 64 años. La incidencia también es mayor en hombres y en raza blanca (Dantas-Torres, 2007). Entre 90 y 93% de los casos en los Estados Unidos ocurren en los meses de abril a septiembre, periodo en el cual las garrapatas vectores son más activas. Los casos de FMMR son encontrados con mayor frecuencia en áreas rurales; sin embargo, también se han reportado casos en áreas urbanas como Nueva York. Habitar en áreas boscosas o de pastizales altos y estar en contacto con

perros incrementa el riesgo de ser infectado por el patógeno (Dantas-Torres, 2007).

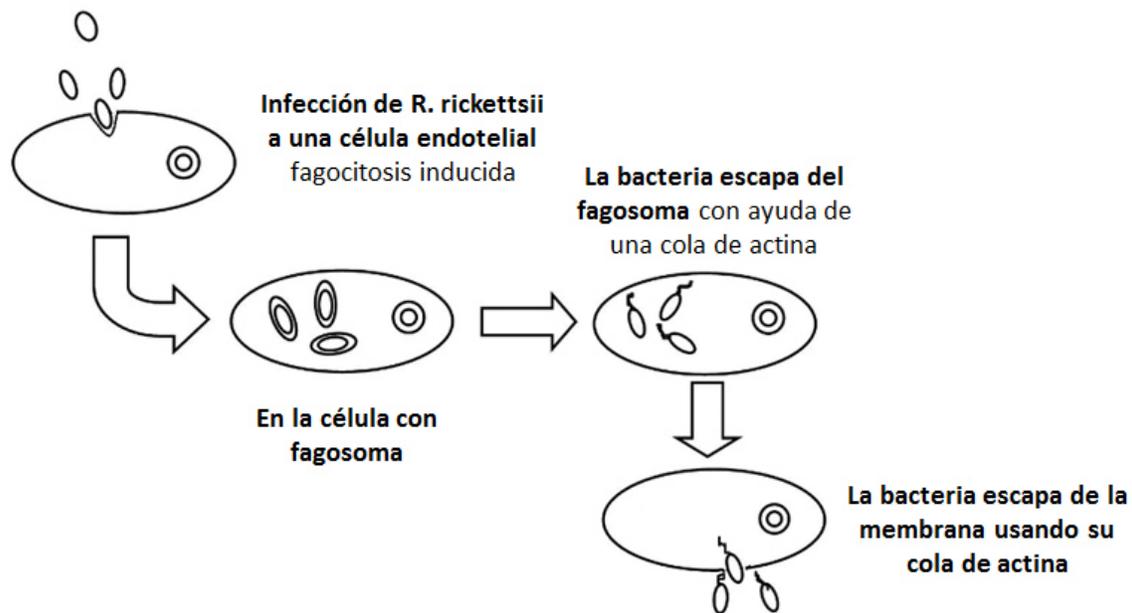
### **Patogenia:**

Este concepto está definido con base en dos componentes esenciales:

1. La secuencia de eventos (transmisión, la introducción en un sitio anatómico particular, la vía de dispersión por una ruta anatómica determinada, evasión de la defensa del hospedero y crecimiento de acuerdo a su localización en el cuerpo)
2. Los mecanismos de lesión celular, a tejidos, a órganos, y al hospedero como un todo (Rydkina *et al.*, 2002).

Para las bacterias que son intracelulares obligadas, la patogénesis es un concepto que involucra múltiples pasos: 1) transmisión, 2) entrada, 3) diseminación inicial desde el punto de entrada hacia otros órganos, 4) contacto con la célula “blanco” (adherencia e invasión), 5) supervivencia en el hospedero (abolición de las defensas del huésped y adaptación al ambiente del hospedero) y 6) extensión del nicho (modulación de la biología del hospedero, multiplicación y supervivencia). Generalmente, la mayoría de las rickettsias patógenas, como *R. rickettsii*, sobreviven en una relación comensal con un vector no vertebrado, los cuales sirven como un reservorio primario. En el caso de los humanos se trata de una infección accidental (hospederos accidentales), en donde el organismo no puede propagarse. Los principales reservorios de esta zoonosis, por los cuales los humanos (con mayor frecuencia) adquieren la infección son perros y ratones salvajes. Generalmente los humanos no se percatan de la picadura de la garrapata debido a que ésta es indolora. La enfermedad se transmite durante la alimentación hemática, cuando las secreciones salivales de la garrapata entran en contacto en el interior de los vasos sanguíneos dérmicos. Los microorganismos se introducen a través de la piel, y alcanzan el torrente sanguíneo a través

de los vasos capilares y linfáticos. Estudios anteriores han demostrado que no es necesario gran número de bacterias vivas para provocar infección clínica aparente. La diseminación a través del torrente sanguíneo se continúa con el ataque al endotelio vascular. Las rickettsias utilizan a las células endoteliales de los capilares como célula diana primaria en las infecciones in vivo, esto causa un incremento en la permeabilidad capilar con consecuencias frecuentes de edema periférico y pulmonar, así como lesiones febriles en hospederos mamíferos. Este ataque a las células diana provoca la liberación de mediadores intra y extracelulares que concluye con la activación de la cascada de las proteincinasas. Las rickettsias tienen una patogenia similar entre ellas, que consiste en una vasculitis de pequeños vasos por infección directa de las células endoteliales, lo cual origina un infiltrado linfocitario perivascular. Muchos mecanismos para inducir permeabilidad microvascular han sido propuestos dentro de los que se incluyen: 1) denudación endotelial; 2) efectos directos como resultado de la infección endotelial por rickettsias; y 3) modulación paracrina y autocrina por citocinas, prostaglandinas, así como productos de la cascada de la coagulación y fibrinólisis. Cuando la bacteria se pone en contacto con las células endoteliales, induce su propia fagocitosis, y una vez en el citosol, escapa del fagosoma y prolifera por fisión binaria simple, siendo por último expulsada por exocitosis para seguir infectando células contiguas. La infección inicia en la zona de inoculación, y se va extendiendo de célula a célula; las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas pueden polimerizar filamentos de monómeros de actina en el citoplasma celular en uno de sus polos, y se disemina mediante la circulación venosa, produciendo al final una pléyade de cientos de focos parchados de vasculitis multisistémica (Warner y Marsh, 2002, Bernabeu y Segura, 2005, Phongmany *et al.*, 2006, Rydkina *et al.*, 2010, Piranda *et al.*, 2008, Matri, 2009).



**Figura 3.** Diagrama de Infección de *Rickettsia rickettsii* Invadiendo una célula

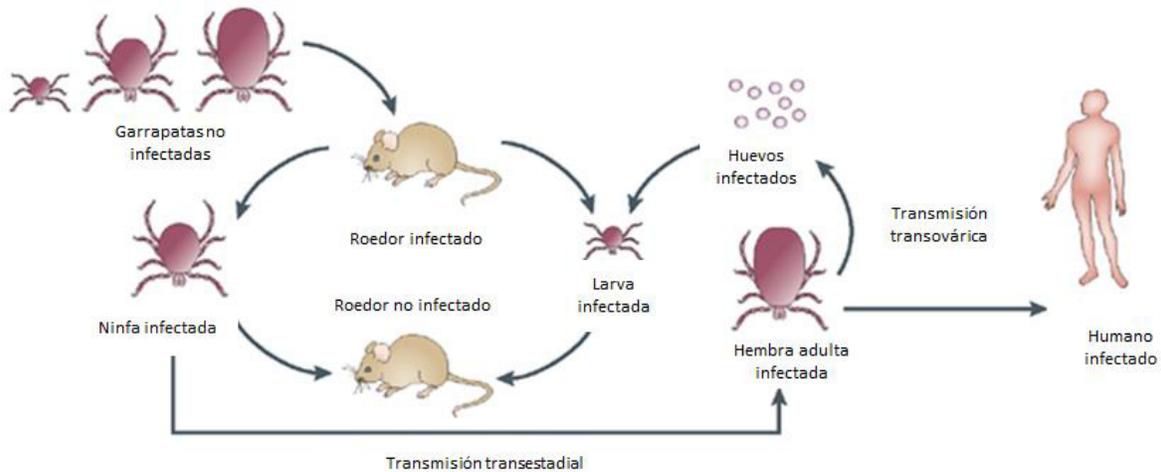
Antes de existir los antibióticos los rangos de mortalidad eran tan elevados como 70 a 80% en algunas áreas, actualmente, estos rangos han disminuido de 2 a 15%. La probabilidad de mortalidad depende de varios factores, como son de la edad del paciente, tiempo transcurrido antes de iniciado el tratamiento, etc (Burgdorfer *et al.*, 1966).

### **Reservorios naturales y modo de transmisión:**

*R. rickettsii* tiene varios géneros y especies de la familia Ixodidae que fungen como reservorios naturales. Esta bacteria puede mantener la infección a través de muchas generaciones de garrapatas. Sin embargo, no es raro encontrar a *R. rickettsii* en animales domésticos como es el perro y así como en una amplia distribución de mamíferos. Aún no está bien comprendido cual es el papel de estos animales como reservorios de la infección. En Estados Unidos el vector primario es la garrapata del perro americano (*Dermacentor variabilis*). En Canadá y en la región de las Montañas Rocosas la garrapata del bosque de

las Montañas Rocosas es el vector más importante. En el caso de México La garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) aparece como vector primario de la *R. rickettsii*. El resto de Centro y Sudamérica La garrapata cayenne (*Amblyomma cajennense*) es el principal vector de *R. rickettsii*. Sin embargo, se sospecha que existen otras especies de garrapatas involucradas en la transmisión de *R. rickettsii* (Dantas-Torres, 2007).

Una garrapata infectada que actúa tanto de reservorio como de vector del patógeno puede transmitir *R. rickettsii* con una de sus picaduras. Cuando la garrapata infectada se alimenta de la sangre de un mamífero, ocurren una serie de fenómenos de reactivación, transformando a *R. rickettsii* de un estado durmiente a uno virulento o altamente patógeno. Para que esto ocurra es necesario que la garrapata se alimente por un periodo mínimo de cuatro a seis horas; sin embargo, puede ser tan largo como de 24 horas. Existe la posibilidad de que el contacto con tejidos o fluidos de la garrapata pueda provocar la infección, así como por inhalación de aerosoles contaminados (reportados solamente en laboratorios) o por transfusión sanguínea. Se debe ser cuidadoso al momento de remover a la garrapata, para evitar el contacto con tejidos o fluidos de la misma (Dantas-Torres, 2007) (Chapman, 2006).



**Figura 4.** Ciclo de transmisión de *Rickettsia rickettsii* (David H. Walker & Nahed Ismail, 2008)

### Situación en México:

En 1925 Hoffman realiza la primera monografía sobre la FMMR en México, en el estado de Sinaloa. Las primeras tres muertes fueron reportadas en Gómez Palacio, Durango en 1939 en pacientes con un cuadro sugestivo de tifo pero sin presencia de piojos (De Lara y Cárdenas, 2008). Los primeros tratamientos utilizados en la era preantibiótica fueron seroterapia y metales pesados como arsénico y mercurio, pero estos tuvieron resultados opuestos. Al comienzo de la era de los antibióticos, el primer tratamiento efectivo fue el ácido paraaminobenzoico (Nickerson y Malik, 2012).

Para los primeros años de la década de 1940 ya se habían reportado diversos casos de FMMR en varios estados de la República Mexicana. En la figura 5 se pueden observar los estados y el año en que fueron reportadas los primeros casos de *Rickettsia* en México. En esa misma década se inician los tratamientos con cloranfenicol y tetraciclinas, disminuyendo así la letalidad causada por la enfermedad, siempre y cuando el tratamiento fuera

administrado de manera temprana. (De Lara y Cárdenas, 2008, Dantas-Torres, 2007). En el Fuerte Sinaloa se aísla por primera vez el patógeno de una muestra de sangre. También en Sinaloa Bustamante, Ortiz Mariotte y Varela en el año de 1945 identifican a la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) como vector de la FMMR. Ese mismo año se describe a la enfermedad como a su vector haciendo referencia a su alta letalidad que en ese entonces era cercana al 70% en la Comarca Lagunera.

A diferencia de lo que se reporta en los Estados Unidos de Norteamérica, donde anualmente se notifican entre 250 y 1,200 casos nuevos de la enfermedad, en México en los últimos 16 años se ha registrado una incidencia de 55 casos. En México, es común la proximidad de los humanos con los animales domésticos, y el hábitat de ambos se encuentra estrechamente relacionado. Por citar un ejemplo, en zonas rurales y suburbanas, ratones y ratas a menudo habitan en patios y casas. La potencial transmisión de muchos vectores de enfermedad, como en el caso de las rickettsiosis, es evidente a través de la exposición a ectoparásitos vectores (Zavala-Castro *et al.*, 2006).

La rickettsiosis representa un desafío para la Salud Pública Mexicana dado su carácter de enfermedad emergente a la que se le adiciona, además de la complejidad social, la dificultad en el diagnóstico. Es una enfermedad poco conocida y difundida en nuestro medio, esto genera que sus síntomas se asocien a otras enfermedades. Las personas afectadas rara vez refieren haber sentido picaduras o prurito, por lo que el vector puede pasar inadvertido (Meneses *et al.*, 2010).

Desde 1930 se tienen registros de la presencia clínica de la enfermedad en México y actualmente la enfermedad se distribuye, con mayor prevalencia, en los estados del norte del país con climas cálidos y áridos. En los pacientes no tratados el desenlace puede ser fatal, la tasa de mortalidad puede ser hasta del 35%. Los datos más recientes muestran que

son 25 estados de la República Mexicana los que han reportado casos confirmados de la enfermedad (Álvarez-Hernández, 2010).

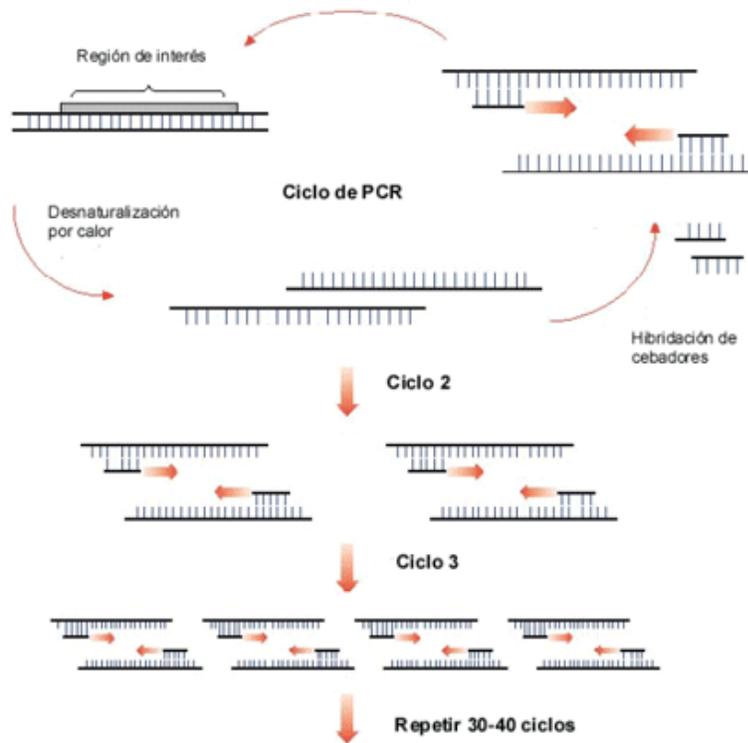


**Figura 5.** Mapa de México mostrando el periodo y la región donde fueron reportados casos humanos de *Rickettsia rickettsii*

### **DETECCIÓN MOLECULAR DE *RICKETTSIA RICKETTSII***

Los métodos de secuenciación como el PCR actualmente se utilizan como herramientas sensibles y rápidas para detectar e identificar rickettsias en sangre y muestras de biopsia de piel en todo el mundo en el que estas instalaciones están disponibles. Los primers amplifican secuencias de varios genes, entre ellos ompA, ompB ompB, gltA, y el gen D (Brouqui *et al.*, 2004, Fournier *et al.*, 2003, Ishikura *et al.*, 2003, Roux *et al.*, 1997,

Sekeyova *et al.*, 2001). Las garrapatas también se pueden usar como herramientas epidemiológicas para detectar la presencia de un patógeno rickettsioso en un área específica, y proporciona información y descubrimientos sobre su patogenicidad (Parola y Raoult, 2001).

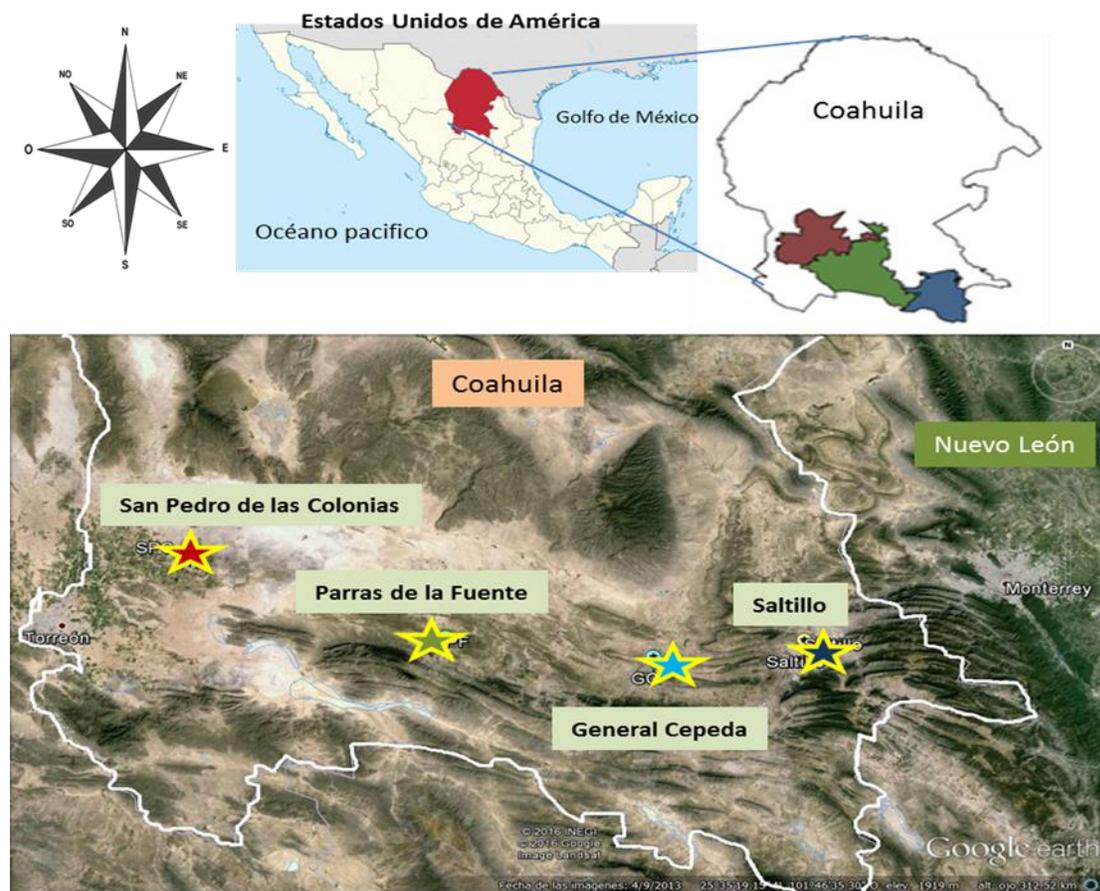


**Figura 6.** Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

## MATERIAL Y METODOLOGIA

### ÁREA DE ESTUDIO

El muestreo se realizó en las ciudades de San Pedro, Saltillo, General Cepeda y Parras de la Fuente en el estado de Coahuila, México. En la figura 7 se observan la distribución relativa de los municipios de donde se obtuvieron las garrapatas y en la tabla 1 la proporción de muestras obtenidas por localidad.



**Figura 7.** Distribución relativa de los sitios de muestreo para la obtención de garrapatas a partir de caninos en el estado de Coahuila, México.

## **Localización y características geográficas de los municipios muestreados**

### **San Pedro de las Colonias**

El municipio de San Pedro se localiza en el suroeste del estado de Coahuila, en las coordenadas 102°58 '58" longitud oeste y 25°45 '32" latitud norte, a una altura de 1,090 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el municipio de Cuatrociénegas; al noroeste con el de Sierra Mojada; al sur con los de Viesca, Parras y Matamoros, al este con los de Parras y Cuatrociénegas y al oeste con los de Francisco I. Madero y Matamoros. Se localiza a una distancia aproximada de 230 kilómetros de la capital del estado.

El clima en el municipio es de subtipos secos semicálidos; la temperatura media anual es de 16 a 18°C; en la parte norte-centro; en la parte sur-sureste de 20° a 22° y la precipitación media anual se encuentra en el rango de los 200 a 300 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de mayo, junio, julio, agosto, septiembre y octubre; los vientos predominantes soplan en dirección sur a velocidades de 20 a 27 km/h. La frecuencia de heladas es de 0 a 21 días y granizadas de cero a un día. La vegetación está compuesta por matorral espinoso, mezquite, huizache, pinabete, chaparro, candelilla, guayule, palma, lechuguilla, maguey y gobernadora. La Fauna se destaca por la presencia de lagartija, víbora de cascabel, camaleón, coyote, zorrillo, venado, codorniz, conejo, liebre, faisán y pato silvestre. (INEGI, 2013)

En el municipio de San Pedro se obtuvieron garrapatas de perros de localidades rurales así como del Centro antirrábico dentro de la zona urbana. Las comunidades rurales muestreadas fueron: Santa Rita, Mayran y San Nicolás (ver figura 1), estas comunidades tienen 99, 1521 y 169 habitantes; respectivamente.

## **Saltillo**

El municipio de Saltillo se encuentra localizado en el extremo sureste del estado de Coahuila y en los límites con los estados de Nuevo León y Zacatecas, tiene una extensión territorial de 6,837 kilómetros cuadrados que equivalen al 4.51% de la extensión total de Coahuila, sus coordenadas geográficas extremas son 24° 33' - 25° 32' de latitud norte y 100° 44' - 101° 38' de longitud oeste y su altitud fluctúa entre un máximo de 2 000 y un mínimo de 400 metros sobre el nivel del mar. Sus límites corresponden al noreste al municipio de Arteaga, al norte al municipio de Ramos Arizpe, al noroeste al municipio de General Cepeda y al oeste al municipio de Parras, al sur limita con el estado de Zacatecas, en particular con el municipio de Mazapil, Zac. y el municipio de El Salvador, Zac., al este el límite corresponde al estado de Nuevo León y al municipio de Galeana, N.L.

El clima en el municipio de Saltillo es de subtipos secos semicálidos; al suroeste subtipos semisecos templados y grupos de climas secos B y semifríos, en la parte sureste y noreste; la temperatura media anual es de 14 a 18°C y la precipitación media anual en el sur del municipio se encuentra en el rango de los 300 a 400 milímetros; al centro tiene un rango de 400 a 500 milímetros y al norte de 300 a 400 milímetros; con régimen de lluvias en los meses de abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre y escasas en noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo; los vientos predominantes soplan en dirección noreste con velocidad de 22.5 km/h. La frecuencia de heladas es de 20 a 40 días en la parte nortee-noreste y suroeste; y en el resto de 40 a 60 días y granizadas de uno a dos días en la parte sureste y de 0 a un día en el resto. La flora se caracteriza hacia las partes montañosas por el predominio de los bosques de pino-encino, de oyamel, mezclado con matorrales semidesérticos de tipo osetófilo y pastizales naturales. En las regiones intermontañosas y

las llanuras hay una vegetación de matorrales semidesérticos y pastizales inducidos y naturales. La Fauna se circunscribe a especies del semidesierto como codorniz, conejo de cola blanca, liebre y paloma triquera, y entre las especies mayores predomina el venado, el coyote y el leoncillo. Las muestras procedentes de Saltillo se recolectaron a partir de la Zona Urbana (36) y del centro antirrábico (3).

### **General Cepeda**

General Cepeda se encuentra localizado en las coordenadas 25°22'35"N 101°28'30"O y a una altitud de 1,410 metros sobre el nivel del mar en un valle rodeado por serranías y ubicado en una zona predominantemente desértica. El municipio de General Cepeda se ubica en la zona sur de Coahuila, entre la Comarca Lagunera y Saltillo, sus límites son al norte y al este con el municipio de Ramos Arizpe, al sur con el municipio de Saltillo y al oeste con el municipio de Parras de la Fuente. Su extensión territorial es de 3.517 km<sup>2</sup>. El clima en el noroeste del municipio es de subtipos secos templados y al noreste y sur prevalecen los tipos secos semi-cálidos; la temperatura media anual es de 18 a 20°C y la precipitación media anual se encuentra en el rango de los 300 a 400 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de mayo, junio, julio, noviembre, diciembre y enero; los vientos predominantes soplan en dirección sur a velocidades de 8 a 15 km/hr. La frecuencia de heladas es de 8 a 12 días y granizadas de 2 a 5 días. La vegetación es escasa en la mayor parte del municipio y corresponde al tipo de matorral y desierto. Básicamente existen plantas resistentes a las sequías como biznaga, lechuguilla, gobernadora, mezquite, nopales, debido a que en su mayoría el suelo en su mayoría es arenoso. En las sierras del municipio se encuentran bosques formados por cedro, encino, pino y oyamel. La Fauna que predomina son la zorra y el coyote, sin embargo, se pueden encontrar venado cola blanca y

gato montés en la sierra de Paila; y en la sierra de Patos, oso y puma, entre otros. También existen animales pequeños como: Liebre, conejo, zorrillo, ardilla, águila, aura o zopilote, cuervo, gorrión, codorniz, urraca, cuervo, gorrión común o “chilero”, alicante, serpiente y víbora de cascabel. A partir del municipio de General Cepeda se muestrearon en las comunidades Agua de mula (5), Independencia (9) y San Isidro (2). Las comunidades Agua de mula, Independencia y San Isidro tienen 133, 189 y 120, habitantes respectivamente

### **Parras de la Fuente**

El municipio de Parras se localiza en la parte central del sur del estado de Coahuila, en las coordenadas 102°11 '10" longitud oeste y 25°26 '27" latitud norte, a una altura de 1,520 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el municipio de Cuatrociénegas; al noreste con el de San Pedro; al sur con el estado de Zacatecas; al este con los municipios de General Cepeda y Saltillo; y al oeste con el municipio de Viesca. Parras se localiza a una distancia aproximada de 157 kilómetros de Saltillo y cuenta con una superficie de 10,523.86 kilómetros cuadrados. El clima en el sureste, sur y suroeste del municipio es de subtipos semisecos templados; y al noroeste-norte y noreste, de subtipos secos semicálidos; la temperatura media anual es de 14 a 18°C y la precipitación media anual se encuentra en el rango de los 200 a 400 milímetros en la parte norte del municipio y el centro de 400 a 500 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de abril, mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre, y escasas en noviembre, diciembre, enero y febrero; los vientos predominantes soplan en dirección noreste a velocidades de 15 a 23 km/h. La frecuencia anual de heladas es de 0 a 20 días en la parte centro y en el extremo sur de 20 a 40 días, así como granizadas en la parte norte 0 a un día y en la parte centro-sur y sureste es de uno a dos días. La vegetación de la región está formada por mezquite, huizache, ocotillo o

albarda, maguey monso, lechuguilla, guayule, palma zamandoca, candelilla, sotol, mimbre, palo blanco, fresno, pino, cedro, oyamel y cactáceas de diferentes variedades. En la Fauna se encuentran animales silvestres como leoncillo, puma, jabalí, conejo, liebre, venado, oso, coyote, gato montés, tejón, zorra, codorniz, faisán, paloma, zenzontle, gorrión, víboras cascabel y coralillo.

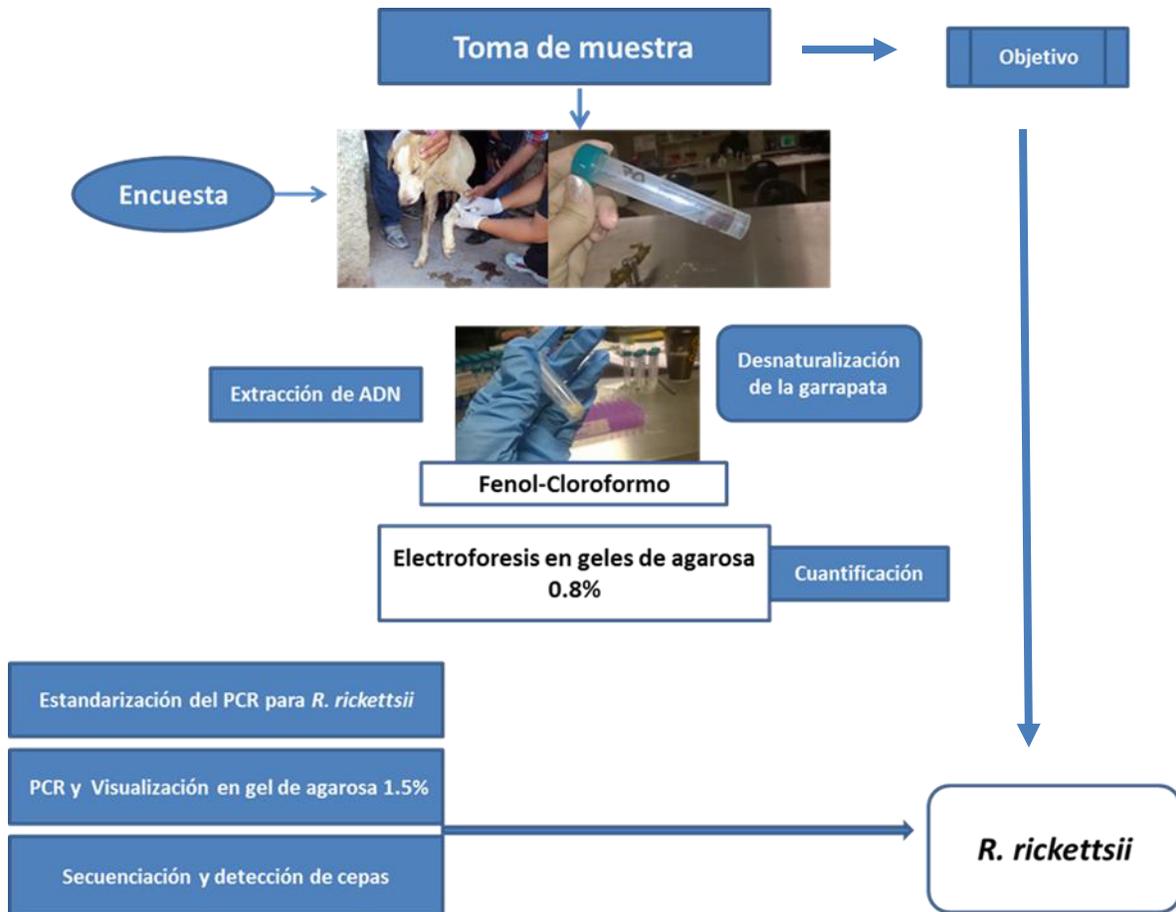
### ÁREA DE TRABAJO

Los ejemplares de garrapata sujetos de estudio fueron analizados en los Departamento de Microbiología, Genética y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL (figura 8).



**Figura 8.** Laboratorios de genética (1), virología (2) y microbiología (3) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## DISEÑO EXPERIMENTAL



## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

### Proporción de perros muestreados y características clínicas generales:

Para determinar el número de caninos a muestrear se utilizó el programa Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for Veterinary Medicine (Thrusfield et al., 2001, Ortega *et al.*, 2000). El tamaño de muestra requerido arrojado por el programa fue de 60

ejemplares caninos por localidad, no obstante por diversas circunstancias fuera del alcance y con excepción del municipio de San Pedro no se obtuvo tal cantidad. La distribución de los perros acorde al municipio y comunidad se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Distribución de los perros muestreados para obtener garrapatas acorde al municipio y comunidad del estado de Coahuila.

Municipio	Comunidad	Perros muestreados	Total por Municipio
San Pedro de las Colonias	Santa Rita	5	60
	Mayran	30	
	San Nicolás	20	
	Centro Antirrábico	5	
Parras de la Fuente	Mirador	40	50
	Centro Antirrábico	10	
Saltillo	Zona urbana	36	44
	Centro Antirrábico	8	
General Cepeda	Agua de Mulas	14	25
	Independencia	9	
	San Isidro	2	

Los perros muestreados fueron de igual manera perros de casa o perros callejeros. Se realizó un examen físico en los perros para observar si existían signos clínicos que pudieran indicar la presencia de *Rickettsia*. Para esto se observó si existía la presencia de petequias o sangrado en mucosas orejas y nariz. En el caso de los perros que tenían dueño se les preguntó sobre la salud de la mascota y se aplicó una pequeña encuesta sobre la higiene y el manejo que se tiene con los perros y los miembros de la familia.

Para el muestreo se extrajeron las garrapatas usando pinzas y guantes. Se trató de extraer el mayor número de garrapatas posibles tratando de obtener un mínimo de 5 garrapatas por perro. Los ejemplares capturados en cada animal se depositaron en viales con alcohol al

70%. Cada muestra, fue identificada, colocando los datos del propietario del perro, lugar y fecha de captura.

### **Identificación de las garrapatas**

La identificación específica de los ejemplares se basó en la observación de sus caracteres morfológicos y comparando las claves dicotómicas descritas en la guía para identificación de ectoparásitos con las garrapatas bajo el estereoscopio (Iroscope, modelo NZ-14).

### **ENCUESTA SOBRE MANEJO E HIGIENE DE LA MASCOTA**

Se realizó un pequeño cuestionario a los dueños de los perros para determinar los factores de riesgo mediante el uso de tablas de contingencia y determinar el riesgo relativo que pudieran presentar las mascotas utilizadas para este estudio.

#### **Desarrollo de la encuesta:**

- ¿El perro habita en el interior de la casa?
- ¿Conviven mucho con el perro?
- ¿El perro tiene acceso a la calle?
- ¿Desparasita a su perro regularmente?
- ¿A sido mordido usted o algún miembro de la familia por alguna garrapata?

### **EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS GARRAPATAS**

#### **Rompimiento de las garrapatas:**

La ruptura de las garrapatas se llevó a cabo bajo el método de FastPrep®-24 (MP Biomedicals) modificado. Se colocó un espécimen en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de con

250 µl de buffer de lisis, una perla de vidrio y vidrio molido. Los microtubos con las muestras fueron sellados con parafilm y cinta adhesiva para evitar derrames y colocados en un FastPrep®-24 (MP BIOMEDICALS) para homogenizar las muestras por un periodo de 15 minutos.

### **Extracción de ADN**

La extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo mediante el método de Ferrer *et al.* (Ferrer *et al.*, 2001). Del material obtenido del rompimiento de la garrapata se agregó todo el contenido en un nuevo tubo Eppendorf y se le agregó 500 µl de buffer de lisis y 40 µl de proteinasa K y se dejó incubar en un AccuBlock (Labnet International Inc.) baño en seco a 65°C por una hora, agitando la muestra en un vortex (VX-100 Lab Vortex Mixer Labnet International Inc.) cada 15 min. Pasada la hora se le agregó a la muestra 500 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1) y se colocó en una centrifuga (Centrifuge 5430 Eppendorf) a 14000 rpm por 15 min.

El sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo y se realizaron 2 lavados con 500 µl de alcohol Isoamílico (27:1) centrifugando por 10 min a 14000 rpm y recogiendo el sobrenadante.

Posteriormente se agregó 65 µl de NaOAC Y 75 µl de NaCl se agitó suavemente por inversión.

Se dejó a -20 °C por 24 horas

La muestra se centrifugó por 10 min a 14000 rpm.

Se recogió el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo al cual se añadió 270 µl de Isopropanol y se dejó a -20°C por 10 min.

La muestra se centrifugó por 10 min a 14000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 500 µl de etanol al 80% grado molecular y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm.

Una vez centrifugada se eliminó el sobrenadante y se puso a secar en la incubadora a 37°C

El ADN se re suspendió en 20 µl de agua milli-Q a -20°C.

## **TÉCNICAS GENERALES EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *Rickettsia rickettsii***

### **Geles de Agarosa al 0.8%**

Se prepararon geles de agarosa al 0.8% en buffer buffer SB 1X para el corrimiento electroforético del ADN que se extrajo de las garrapatas. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron de 90 volts por 25 min, a 90 V, usando GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10, 000 en agua, bajo irradiación de UV en el transiluminador MultiDoc-Lt. Digital Imaging System (Upland CA, USA).

### **Cuantificación de ADN**

El ADN fue cuantificado en el espectrofotómetro Epoch Microplate colocando 5µl del ADN en los pocillos para muestra.



**Figura 9.** Espectrofotómetro Epoch Microplate.

## AMPLIFICACIÓN DE ADN

### Estandarización de la PCR para las cepas control por medio de un gradiente

Para la estandarización de la PCR se realizó un programa de gradiente usando las siguientes temperaturas:

94°C por 4 min, 35 ciclos a (94°C durante 1 min, 47°C-58°C 1 min y a 72°C 1 min) con un ciclo final de 72°C por 10 min (tabla 2).

**Tabla 2.** Programa para la PCR gradiente

Temperatura °C	Tiempo	N° de Ciclos
94 ° C	4 minutos	1 ciclo inicial
94 ° C	1 minuto	
47-58 ° C	2 minutos	35 ciclos
72 ° C	1 minuto	
72 ° C	10 minutos	1 ciclo final

## PCR:

Ya establecidas las condiciones adecuadas para la realización de la amplificación se siguió el protocolo de la siguiente manera.

Las muestras del DNA genómico de las garrapatas fueron amplificadas por PCR en una mezcla de reacción de 25  $\mu$ l conteniendo tampón PCR 1 x 5  $\mu$ l, 200  $\mu$ M de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M de cada iniciador Tz-15 -19 (5'-TTCTCAATTCGGTAAGGGC-3' y Tz-16- 20 5'-ATATTGACCAGTGCTATTTC-3') (Tzianabos et al., 1989) (Tabla 3 y 4) 1,25 U/ $\mu$ l Taq DNA polimerasa (Invitrogen, San Diego, Calif). La amplificación se realizó usando el siguiente protocolo: 94°C por 5 min, 40 ciclos a 94°C durante 1 min, 58 °C 1 min, finalmente a 72°C 1 min (Tabla. 3). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador MiniCycler (TM MJ Research INC, NY, USA). Como control positivo se usó la cepa de referencia de *R. rickettsii* strain Bitterroot proporcionada por el Dr. Christopher D. Paddock (CDC Atlanta, GA 30333). En cada experimento se colocaron controles negativos agregando agua MiliQ estéril.

**Tabla 3.** Primers utilizados para la amplificación de ADN de *Rickettsia rickettsii*.

Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Diana	Fragmento (pb)	Referencia
Tz-15				
Forward	TTCTCAATTCGGTAAGGGC	Gen 16S	246 pb	Tzianabos et al. 1989
Tz-16				
Reverse	ATATTGACCAGTGCTATTTC			

**Tabla 4.** Componentes y concentraciones que conformaron la mezcla para PCR.

Componentes	Concentración
Master Mix	12.5 $\mu$ l
Cebador F	0.5 $\mu$ l
Cebador R	0.5 $\mu$ l
H2O	7.5 $\mu$ l
ADN	4.0 $\mu$ l
Volumen final	25 $\mu$ l

**Tabla 5.** Programa para la PCR

Temperatura °C	Tiempo	N° de ciclos
94 ° C	5 minutos	1 ciclo inicial
94 ° C	1 minuto	
58 ° C	1 minutos	40 ciclos
72 ° C	1 minuto	

72 ° C

10 minutos

1 ciclo final

---

### **ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA**

Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Tampon TBE (0.09 M Tris, 0:09 M ácido Bórico y 2 MM de EDTA, pH 8.3) a 90 V, usando GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, en agua, bajo irradiación de UV en el transiluminador MultiDoc-Lt. Digital Imaging System (Upland CA, USA).

### **SECUENCIACIÓN DEL ADN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS**

Los productos de PCR fueron secuenciados en el ASBI Prism 3130 system (Applied Biosystems, Foster City CA). Las secuencias de las muestras fueron analizadas mediante el uso de BLAST para comparar con las secuencias disponibles de *R. rickettsii* en Genbank

### **MÉTODO PARA EL ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO**

Para la encuesta la información se procesará siguiendo procedimientos normalizados de trabajo que incluyen la entrada de la información y la detección de inconsistencias.

La descripción de las variables cualitativas se realizará mediante tablas de frecuencias y en las cuantitativas mediante parámetros de centralización y dispersión.

Asimismo, se calcularon los intervalos de confianza (IC) para un 95% de seguridad.

La relación entre las variables cualitativas se evaluará mediante el test de la ji cuadrada, así como el riesgo relativo de los factores tomados en cuenta en la encuesta utilizando el programa Graph Pad Prism 7.

## RESULTADOS

### IDENTIFICACIÓN DE LAS GARRAPATAS

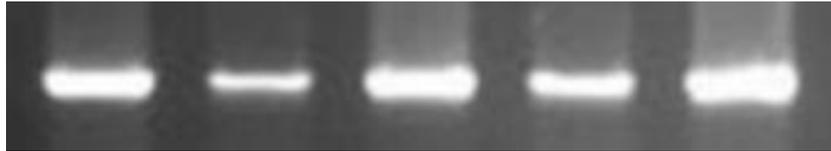
Del total de garrapatas recuperadas en las regiones muestreadas (San Pedro, Parras y Saltillo) todos los ectoparásitos identificados pertenecieron a la especie de *Rhipicephalus sanguineus*. En la figura 10 se observan fotografías de las garrapatas caracterizadas



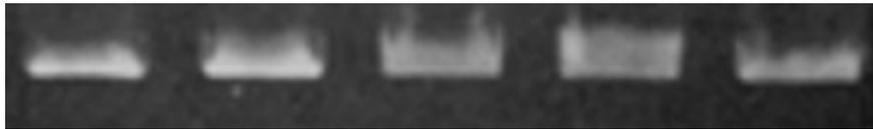
**Figura 10.** Garrapata *Rhipicephalus sanguineus* observada bajo el estereoscopio

### EXTRACCION DE ADN

El método utilizado para la extracción de ADN fue el método de Ferrer (fenol-cloroformo-alcohol isoamilico 50-49-1) previamente descrito. El análisis bajo la luz UV del transiluminador reveló que con este método fue posible extraer exitosamente el ADN de las garrapatas de las tres ciudades del estado de Coahuila como se observa en las figuras 11, 12 y 13.



**Figura 11.** ADN de muestras de garrapatas de San Pedro con el método de fenol-cloroformo



**Figura 12.** ADN de muestras de garrapatas de Saltillo con el método de fenol-cloroformo

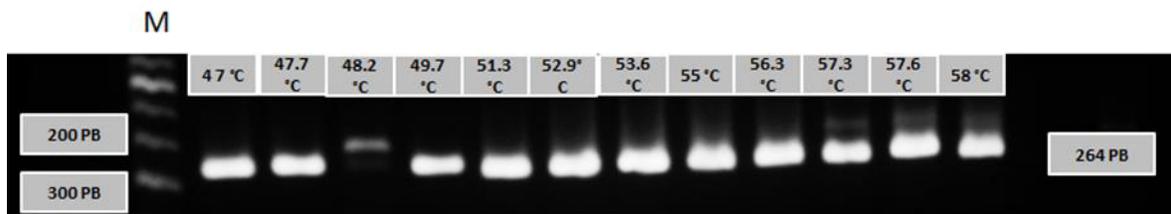


**Figura 13.** ADN de muestras de garrapatas de Parras con el método de fenol-cloroformo

## ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR

Se procedió a estandarizar la amplificación del ADN de garrapata, para lograrlo se realizó un gradiente de temperatura en un rango de los 47°C a los 58°C, esto con la finalidad de determinar la temperatura óptima de amplificación que se pudiera aplicar de igual manera para las muestras de las tres ciudades para la posterior amplificación por PCR.

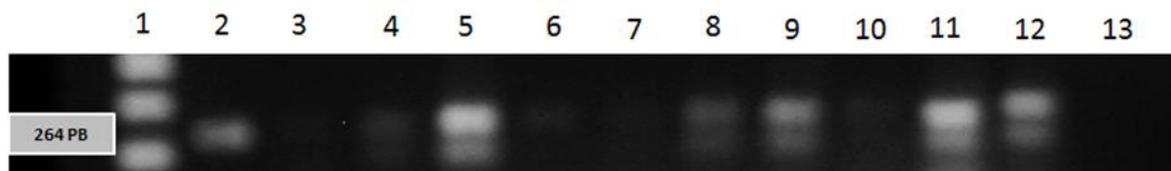
En la figura... se muestran los resultados del PCR gradiente. Como se observa se las mejores temperaturas de alineamiento fueron las de 57.3, 57.6 y 58°C.



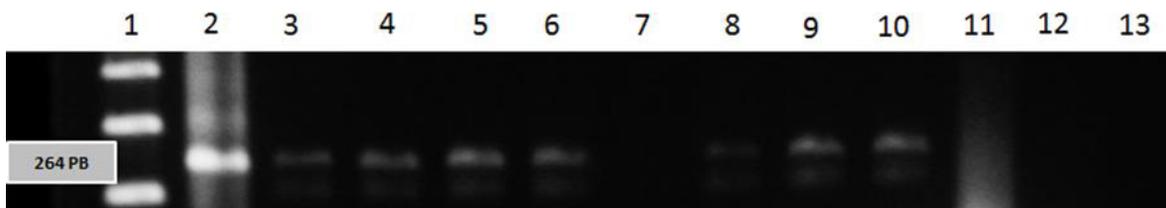
**Figura 14.** Gradiente de estandarización de la PCR para *R. rickettsii*

## AMPLIFICACIÓN POR PCR

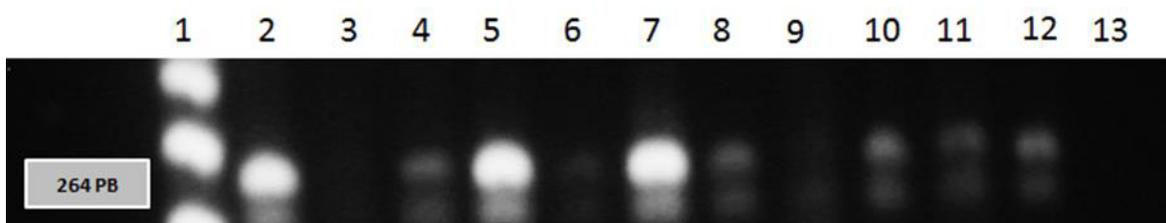
En las figuras 15, 16 y 17 se pueden observar los resultados de los productos amplificados de las muestras de San Pedro, Parras y Saltillo-General Cepeda. El control de *R. rickettsii* mostró un peso molecular de 246 pb al igual que las muestras analizadas.



**Figura 15.** Amplificación de ADN de *R. rickettsii* del Municipio de San Pedro. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: Control positivo 246 pb; Carril 3-12: *R. rickettsii* a partir de *R. sanguineus*; Carril 13: Control negativo



**Figura 16.** Amplificación del ADN de *R. rickettsii* de Saltillo-General Cepeda. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Control positivo 246 pb; Carril 3-12: *R. rickettsii* de las muestras de garrapatas; Carril 13: Control negativo



**Figura 17.** Amplificación del ADN de *R. rickettsii* de las garrapatas de Parras. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: Control positivo (246 pb); Carril 3-12: muestras; Carril 13: Control negativo

### Recuperación de *R. rickettsii* en *R. sanguineus* en San Pedro, Saltillo y Parras

En la tabla 7 se puede observar los porcentajes encontrados en San Pedro, Saltillo y Parras de la Fuente. A partir de 60 perros en cada localidad. De las 180 garrapatas analizadas (n=180), el mayor porcentaje de muestras positivas fue encontrado en la entidad de Parras con un 80% (48/60), seguido de San Pedro con 65 (39/60) y finalmente la ciudad de Saltillo con un 47% (28/60) (tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de positividad de las muestras colectadas en las ciudades estudiadas de Coahuila a partir de 60 perros de cada localidad.

Municipio	Muestras (perros)	Positivas (garrapatas)	Negativas (garrapatas)	Porcentaje de positividad
-----------	----------------------	---------------------------	---------------------------	------------------------------

San Pedro	60	39	21	65%
Saltillo-General Cepeda	60	28	32	47%
Parras	60	48	12	80%
Total	180	115	65	64%

### ENCUESTA SOBRE MANEJO E HIGIENE DE LA MASCOTA

La encuesta no se aplicó para todos los perros que fueron muestreados; debido a que algunos animales no tenían propietarios. Para el estudio solo se tomaron en cuenta 20 cuestionarios de San Pedro y 9 de Saltillo, de acuerdo a lo anteriormente mencionado. Para dicho análisis se realizó la prueba de tablas de contingencia para analizar el riesgo relativo sobre el manejo e higiene de las mascotas en relación a los factores de riesgo que pudieran presentar los animales revisados.

En la tabla 7 se presentan las preguntas del cuestionario relacionadas como factores de riesgo de que el perro adquiriera las garrapatas infectadas y su porcentaje de respuestas otorgadas por los propietarios.

**Tabla 7.** Cuestionario de factores de riesgo.

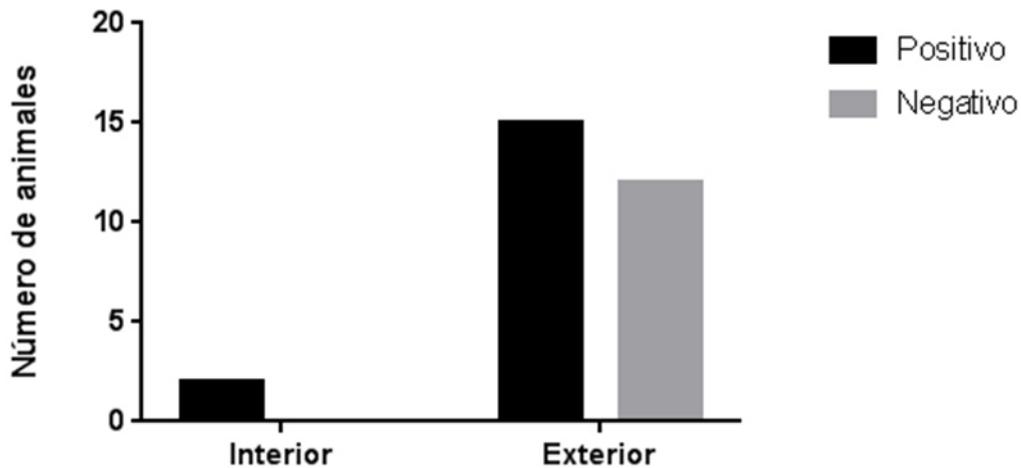
Pregunta	Si	No
¿El perro tiene acceso a la calle?	25 (80%)	4 (20%)
¿Baña a su perro con frecuencia?	15 (80%)	14 (20%)
¿Desparasita a su perro regularmente?	12 (60%)	17 (40%)

En la tabla 8 se observan las preguntas del cuestionario relacionadas como factores de riesgo de que el propietario adquiera el patógeno transmitido por la garrapata de la mascota y su porcentaje de respuestas otorgadas por los propietarios.

**Tabla 8.** Porcentaje de propietarios que tienen un trato cercano con las mascotas

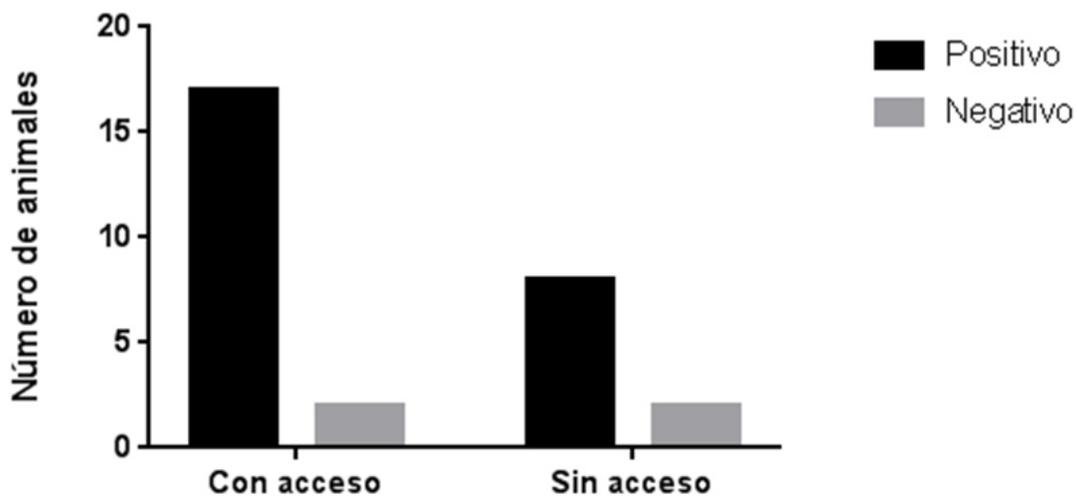
Mascotas que habitan dentro de casa	2 (14%)
Propietarios que conviven mucho con el perro	23 (79%)
Propietarios que fueron picados por la garrapata	2 (7%)

Mediante el análisis las tablas de contingencia de los factores de riesgo así, como el riesgo relativo de adquirir la *Rickettsia* tanto perros como propietarios. En la figura 18 se observa el número de animales muestreados con garrapatas tanto positivas como negativas a la *Rickettsia* que habitaban en el interior de la casa, y los que habitaban en el exterior. De acuerdo a los resultados analizados arrojaron un valor de significancia de 0.4975 dejando claro que el hábitat de la mascota no funge como factor de riesgo para que el animal adquiera la garrapata infectada. Teniendo un riesgo relativo de 1.8 en los animales que se encuentran en el exterior.



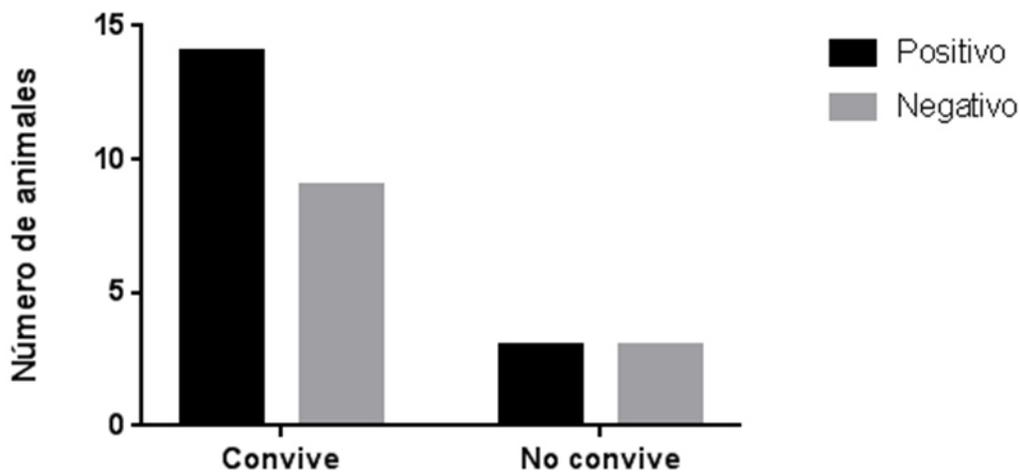
**Figura 18.** Las barras oscuras representan los perros muestreados con garrapatas que fueron positivas a *R. rickettsii* tanto los que habitaban en el interior, como en el exterior de la casa. Las barras claras representan los perros muestreados con garrapatas que fueron negativas a *R. rickettsii*.

En la figura 19 se expone el número de animales muestreados con garrapatas tanto positivas como negativas a *Rickettsia* que tenían acceso a la calle, y los que no lo tenían. Los resultados estadísticos nos muestran un valor de significancia de 0.5920 donde se observa que el acceso a la calle no es considerado como factor de riesgo para que el animal adquiera la garrapata infectada. Teniendo un riesgo relativo de 1.18 en los animales que tienen acceso a la calle.



**Figura 19.** Las barras oscuras representan los perros muestreados con garrapatas que fueron positivas a *R. rickettsii* tanto los que tenían acceso a la calle, como los que estaban dentro. Las barras claras representan los perros muestreados con garrapatas que fueron negativas a *R. rickettsii*.

En la figura 20 se puede observar el número de animales muestreados con garrapatas tanto positivas como negativas a *Rickettsia* que tenían una convivencia cercana con sus y los que no tenían convivencia con sus propietarios. El valor de significancia de 0.6693 encontrado muestra que la convivencia y atención que el propietario pueda tener con la mascota no funge como factor de riesgo para que el animal adquiriera la garrapata infectada. Teniendo un riesgo relativo de 1.2 en los animales que no tienen convivencia con su propietario.



**Figura 20.** Las barras oscuras representan los perros muestreados con garrapatas que fueron positivas a *R. rickettsii* tanto los que tenían convivencia cercana con sus dueños, como los que no la tenían. Las barras claras representan los perros muestreados con garrapatas que fueron negativas a *R. rickettsii*.

En la figura 21 se expone el número de animales muestreados con garrapatas tanto positivas como negativas a *Rickettsia* que eran desparasitados de manera externa (baños con asuntol e inyección de ivermectina) por sus dueños, y los que no recibían desparasitación externa. Los resultados nos muestran un valor de significancia de 0.3701 lo cual, la falta de desparasitación externa con asuntol e ivermectina no es un factor de riesgo para que el animal adquiera la garrapata infectada. Teniendo un riesgo relativo de 1.199 en los animales que no tienen desparasitación externa.



## DISCUSIÓN

Las garrapatas son consideradas como parte importante entre los vectores de mayor interés desde el punto de vista de Salud Pública, por su gran participación en la transmisión de microorganismos patógenos como bacterias, helmintos, protozoarios y virus que afectan a los animales y al humano (Dantas-Torres et al., 2012, Dantas-Torres, 2010). Estos ectoparásitos colaboran de una manera importante en el papel vectorial, como reservorios o reproductores de una manera importante de las rickettsias del grupo conocido como fiebres manchadas, destacando la participación de diferentes géneros de la familia Ixodidae (Parola et al., 2005), entre los que se encuentran *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Amblyomma*, considerados como los principales artrópodos transmisores de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. massiliae* y *R. africae* en América (Parola et al., 2009, Guglielmone et al., 2006).

En México entre 1930 a 1950 se presentaron casos de Fiebre Manchada en diferentes estados como Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora, compartiendo como único vector a *R. sanguineus* (Bustamante, 1943, Mariotte et al., 1944, Bustamante y Varela 1947); a diferencia de vectores implicados en el sur del país específicamente en el estado de Veracruz fue reportado un caso en que *Amblyomma cajennense* fue responsable de la transmisión de rickettsiosis (Bustamante y Varela, 1946). En este trabajo se tomaron muestras de 180 perros con garrapatas identificándose el 100% como principal artrópodo vector a la especie *R. sanguineus*, estos datos concuerdan con otros estudios en México, reportado por Tinoco et al. (2009) en el cual se tomaron muestras de 348 perros de la calle, en estos animales fueron caracterizados al 100% como *R. sanguineus* a todos los individuos. De igual forma estudios presentados por Cruz et al. (1998) de 349 caninos obtuvieron también el 100% de presencia de esta especie en las garrapatas identificadas.

En este estudio se encontró una prevalencia del 65% en San Pedro, 51% en Saltillo-General Cepeda; y 80% en Parras, estos datos fueron similares a los encontrados por Khrouf et al., 2014 con valores que oscilaron entre 11.1% hasta 65.2 % en garrapatas de la especie *R. sanguineus*, a diferencia de los resultados encontrados por Castillo-Martínez et al. 2015 en su estudio realizado en Matamoros Coahuila, a partir de 217 garrapatas (*R. sanguineus*) de 72 perros, en el cual solo encontraron un 4% de prevalencia de *Rickettsia* spp de las muestras analizadas, estos valores fueron muy bajos comparados con los datos reportados en las tres poblaciones en esta investigación.

De los resultados sobre los factores de riesgo mediante el uso de tablas de contingencia para establecer el riesgo relativo de los animales de San Pedro y Saltillo-General Cepeda analizados en esta investigación, ninguno represento un factor de riesgo relativo para que el animal adquiriera la garrapata infectada. De acuerdo a lo obtenido en este análisis, se detectó la necesidad de aplicar otros datos en la encuesta como tamaño de muestra, poblaciones de perros con y sin garrapatas, edad de los perros, grado de infestación de garrapatas en el perro, que pudieran enriquecer y a la vez fortalecer el análisis (De Lacerda et al., 2004, Goossens et al., 2001, Merino et al., 2000)

## Conclusiones

Las muestras de garrapatas colectadas en San Pedro, Parras y Saltillo-General Cepeda fueron identificadas en un 100% como *Rhipicephalus sanguineus*

Los resultados por PCR de las muestras analizadas utilizando los cebadores propuestos por Tzianabos (Tz -15-19 y Tz-16-20), amplificaron a 246 pb, lo cual está especificado para *Rickettsia rickettsii*

La comprobación por secuenciación de los productos amplificados mediante los cebadores Tz -15-19 y Tz-16-20 fueron *R. rickettsii* str. Morgan con un 100 % de homología con las cepas reportadas en Genbank.

Basado en lo anterior, existe una alta frecuencia de *R. rickettsii* str. Morgan en garrapatas de perros de todas las localidades analizadas.

De acuerdo a los datos analizados mediante la encuesta aplicada a los propietarios de mascotas de San Pedro y Saltillo-General Cepeda, utilizando tablas de contingencia, en esta investigación no proporciono datos suficientes para determinar factores de riesgo relativo que pudieran ser importantes para que el animal adquiriera la garrapata infectada.

Basados en los datos del presente trabajo es necesario realizar estudios posteriores para determinar el papel de *R. rickettsii* str. Morgan en la presentación de casos de brotes febriles en los cuales este incluido el vector *Rhipicephalus sanguineus*,

Es necesario establecer medidas preventivas y de manejo para evitar la infección por *R. rickettsii* tanto en la población humana y animal de la región analizada.

## BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Hernández, G. (2010). La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, una epidemia olvidada. *Sal Púb México*. 52 (1): 01–03.

Álvarez Hernández, G, Contreras Soto, JJ. (2013). Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de Sonora, 2004-2012. *Sal Púb México*, 55(2): 151–152.

Anderson, B, McDonald G, Jones D, Regnery R. (1990). A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Inf immune*. 58(9): 2760–2769.

Azad A, Beard, C. (1998). Rickettsial Pathogens and their Arthropod vectors. *Em Inf Dis*. 4(2): 179–186.

Bavaro, M F, Kelly, D J, Dasch, G A, Hale, B R, Olson, P. (2005). History of U.S. Military Contributions to the Study of Rickettsial Diseases. *Mil Med*, 170(4S): 49-60

Bernabeu-Wittel, M, Segura-Porta, F. (2005). Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enf Inf y Microbiol Clín*. 23(3): 163–172.

Biggs, HM, Behravesh, CB, Bradley, KK, Dahlgren, FS, Drexler, NA, Dumler, JS, Traeger, MS. (2016). Diagnosis and management of Tickborne Rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever and other spotted fever group Rickettsioses, Ehrlichioses, and anaplasmosis — United States. *MMWR. Rec and Rep.* 65(2): 1–44.

Blair, P J, Jiang, J, Schoeler, G B, Moron, C, Anaya, E, Cespedes, M, Olson, J. G. (2004). Characterization of spotted fever group Rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *J of Clin Microbiol.* 42(11): 4961–4967.

Brouqui, P, Bacellar, F, Baranton, G, Birtles, RJ, Bjoërsdorff, A, Blanco, JR, Wilske, B. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Inf.* 10(12): 1108–1132.

Burgdorfer, W, Friedhoff, K, Lancaster, J. (1966). Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. *Bull of the Wor Hea Org.* 35(2): 149–53.

Bustamante ME. (1943). Una nueva rickettsiosis en Mexico. Existencia de la fiebre manchada Americana en los estados de Sinaloa y Sonora. *Rev Inst Salub Enferm Trop.* 4: 189-211.

Bustamante ME, Varela G. (1947). III Estudios de fiebre manchada en Mexico: Hallazgo del *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado, en Veracruz. *Rev Inst Salub Enferm Trop.* 7: 75-78.

Castillo- Martínez A, Cueto-Medina SM, Hernández-Rodríguez S, Gallegos-Robles M.A, Valdes-Perezgasga MT, Sánchez-Ramos FJ, Ortega- Morales AI. (2015). Detección de *Rickettsia* sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México. Acta Zoológica Mexicana (n. s.). 31(1): 80-83.

Cear, J. (1974 ). Vacunas de rickettsias. Bol de la of san Panam. 74 (4): 324-336.

Civen, R, Ngo, V. (2008). Murine typhus: An unrecognized suburban Vectorborne disease. Clin Inf Dis. 46(6): 913–918.

Cruz VC, García VZ, Morales SM. (1998). Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* infestation in dogs in Cuernavaca, Morelos, México. Parasitol 22(1-2): 29-32.

Dantas-Torres, F. (2007). Rocky Mountain spotted fever. The Lan. Inf dis. 7(11): 724–32.

Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Para & Vect, 3(1): 26.

Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: A one health perspective. Tren Paras. 16:1-10. doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003

De Lara Huerta, J, Barragán, RC. (2008). Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en pediatría Revisión clínica de una serie de 115 casos. Enf Inf en Ped, 21.22 (85): 4–9.

De Lacerda, AA, Cuhna, MR, Antunes, DR., Do, NCF, Machado, BR. (2004). Frequency of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs from the metropolitan region of Rio de Janeiro. *Pesq Vet Bras.* 24(4):203-206.

Ericsson, CD, Jensenius, M, Fournier, P, Raoult, D. (2004). Rickettsioses and the international traveler. *Clin Inf Dis.* 39(10): 1493–1499.

Ferrer, C, Colom, F, Frases, S, Mulet, E, Abad, JL, Alio, JL. (2001). Detection and identification of fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol.* 39(8): 2873–2879.

Field-Cortazares, J, Escárcega-Ávila, A, López-Valencia, G, Barreras-Serrano, A, Tinoco-Gracia, L. (2015). Seroprevalence of risk factors associated with rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) in humans in Baja California, Mexico. *Gac méd de Méx.*, 151(1): 42–6.

Fournier Pierre-Edouard, Roux, V, Caumes, E, Donzel, M, Raoult, D. (1998). Outbreak of *Rickettsia africae* infections in participants of an adventure race in South Africa. *Clin Inf Dis.* 27(2): 316–323.

Fournier, PE. (1999). Tick-transmitted infections in Transvaal: Consider *Rickettsia africae*. *Em Infect Dis.* 5(1): 178–181.

Fournier, PE. (2000). Evidence of infection in humans with *Rickettsia helvetica* in eastern France. *Em Inf Dis.* 6(4): 389–392.

Fournier, P, Dumler, JS, Greub, G, Zhang, J, Wu, Y, Raoult, D. (2003). Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. Nov. *Jour of Clin Microbiol.* 41(12): 5456–5465.

Fritzen, CM, Huang, J, Westby, K, Freye, JD, Dunlap, B, Yabsley, MJ, Moncayo, AC. (2011). Infection Prevalences of common tick-borne Pathogens in adult lone star ticks (*Amblyomma americanum*) and American dog ticks (*Dermacentor variabilis*) in Kentucky. *Am Jour of Trop Med and Hyg.* 85(4): 718–723.

Goossens, HAT, van den Bogaard, AE, Nohlmans, M.K.E. (2001). Dogs as Sentinels for Human Lyme Borreliosis in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 39: 844-848.

Grau, LW, Jorgensen, WA. (2007). Handling the Wounded in a Counter-Guerrilla War: The Soviet/Russian Experience in Afghanistan and Chechnya. *J of Spec Op Med.* 7(1): 65–72.

Gray, M. (1998). *Rickettsia*, typhus and the mitochondrial connection. *Nat.* 396(6707): 109–110.

Guedes, E, Leite, RC, Prata, MC, Pacheco, RC, Walker, DH, Labruna, MB. (2005). Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian

spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. Mem do Inst Osw C, 100(8): 841–845.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, *et al.* (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Exp Appl Acarol. 40:83-100. doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0

Hanen, L, Mouna, S, Faten, F, Raida, BS, Moez, J, Yosra, C, Zouhir, B. (2014). An unusual cause of optic neuritis: Rickettsiosis disease. A Pacif J of Trop Biomed. 4(12): 998–1000.

Hay, J, Yeh, KB, Dasgupta, D, Shapieva, Z, Omasheva, G, Deryabin, P, Richards, AL. (2016). Biosurveillance in central Asia: Successes and challenges of tick-borne disease research in Kazakhstan and Kyrgyzstan. Front in Pub H. 4(4):1-6 doi:10.3389/fpubh.2016.00004

Hidalgo, M, Orejuela, L, Fuya, P, Carrillo, P, Hernandez, J, Parra, E, Valbuena, G. (2007). Rocky Mountain spotted fever, Colombia. Em Infect Dis, 13(7): 1058–1060.

Holman, RC, Paddock, CD, Curns, AT, Krebs, JW, McQuiston, JH, Childs, JE. (2001). Analysis of risk factors for fatal Rocky Mountain spotted fever: Evidence for superiority of Tetracyclines for therapy. The Jo of Infect Dis, 184(11): 1437–1444.

Ishikura, M, Ando, S, Shinagawa, Y, Matsuura, K, Hasegawa, S, Nakayama, T, Watanabe, M. (2003). Phylogenetic analysis of spotted fever group Rickettsiae based on gltA, 17-kDa,

and rOmpA genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiol and Immun.* 47(11), 823–832.

Kelly, PJ, Mason, PR, Rhode, C, Dziva, F, Matthewman, L. (1991). Transient infections of goats with a novel spotted fever group rickettsia from Zimbabwe. *Res in Vet Scien.* 51(3): 268–271.

Kelly, D, Richards, A, Temenak, J, Strickman, D, Dasch, G. (2002). The past and present threat of rickettsial diseases to military medicine and international public health. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* J OF Clin Microbiol. 28(10): 2302-2304.

Khrouf F, M'Ghirbi Y, Znazen A, Jemaa MB, Hammami A, Bouattoura A. (2014). Detection of *Rickettsia* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks and *Ctenocephalides felis* fleas from Southeastern Tunisia by reverse line blot assay. *J Clin Microb.* 52 (1): 268-274.

Krusell, A, Comer, JA, Sexton, DJ. (2002). Rickettsialpox in north Carolina: A case report. *Em Infect Dis.* 8(7):727–728.

Lemos, ERS. de, Rozental, T, Villela, CL. (2002). Brazilian spotted fever: Description of a fatal clinical case in the state of Rio de Janeiro. *Rev da Socied Bras de Med Trop.* 35(5): 2760–2769.

Lewin, MR, Bouyer, DH, Walker, DH, Musher, DM. (2003). *Rickettsia sibirica* infection in members of scientific expeditions to northern Asia. *The Lan.* 362(9391): 1201–1202.

Mahara, F. (1997). Japanese spotted fever: Report of 31 cases and review of the literature. *Emer Infec Dis.* 3(2): 105–111.

Mariotte CO, Bustamante ME. (1944). Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora (Mexico) *Rev Inst Salub Enferm Trop* 5: 297–300.

Matri, L E. (2009). Ocular manifestations of Rickettsiosis: 2. Retinal involvement and treatment. *Inter J of Med Scien.* 6(3):128.

Maxcy, K F. (1926). Clinical observations on endemic typhus (Brill's disease) in southern United States. *Pub Heal Rep.* (1896-1970), 41(25): 1213.

McBride, WJH, Hanson, JP, Miller, R, Wenck, D. (2007). Severe spotted fever group Rickettsiosis, Australia. *Emer Inf Dis.* 13(11): 1742–1744.

McQuiston, J, Paddock, C, Singleton, J, Wheeling, J, Zaki, S, Childs, J. (2004). Imported spotted fever rickettsioses in United States travelers returning from Africa: A summary of cases confirmed by laboratory testing at the centers for disease control and prevention, 1999-2002. *The Am J of trop med and hyg.* 70(1): 98–101.

Meneses González, F, Peregrino Rodríguez, G, Olmos Rojas, P. (2010). rickettsiosis una enfermedad presente pero olvidada. *Vig Ep Sem* 46, (27): 2-4.

Merino FJ, Serrano JL, Saz, JV, Nebreda T, Gegundez M, Beltran M. (2000). Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *Eur J Epidemiol.* 16: 97-100.

Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: Why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev.* 22(4): 255–275.

Nickerson, A, Marik, PE. (2012). Life-threatening ANCA-positive vasculitis associated with rickettsial infection. *C Rep.* doi:10.1136/bcr.03.2012.5993

Nunes, E de C, Vizzoni, V F., Navarro, DL, Iani, FC. de M, Durães, LS, Daemon, E, Gazeta, GS. (2015). *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. *Mem do Inst Os C.* 110(8): 1058–1061.

Openshaw, JJ, Swerdlow, DL, Krebs, JW, Holman, RC, Mandel, E, Harvey, A, McQuiston, JH. (2010). Rocky Mountain spotted fever in the United States, 2000-2007: Interpreting contemporary increases in incidence. *Am J of Trop Med and Hyg.* 83(1): 174–182.

Ortega C, de Blas I, Simón MC, Gironés O, García J, Alonso JL, Muzquiz JL, Ruiz-Zarzuela I. Programa informático aplicado al estudio temporal de procesos patológicos en poblaciones animales. *Rev Scientif et Tech de l'Off Inter des Ep.* 2000;19(3):735-43

Paris, D H, Shelite, T R, Day, N P, Walker, D H. (2013). Unresolved problems related to scrub typhus: A seriously neglected life-threatening disease. *Am J of Trop Med and Hyg*, 89(2): 301–307.

Parola, P, Raoult, D. (2001). Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol and Inf.* 7(2): 80–83

Parola P, Paddock CD, Raoult D (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*: 18:719-56. doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005

Parola P, Labruna M, Raoult D. (2009). Tick-borne rickettsioses in America: Unanswered questions and emerging diseases. *Curr Infect Dis Rep.* 11:40-50. doi.org/10.1007/s11908-009-0007-5

Pérez-Osorio, CE, Zavala-Velázquez, JE, León, JJA, Zavala-Castro, JE. (2008). *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emer Infec Dis.* 14(7): 1019–1023.

Perine, PL, Chandler, BP, Krause, DK, McCardle, P, Awoke, S, Habte-Gabr, E, McDade, JE. (1992). A Clinico-Epidemiological study of epidemic typhus in Africa. *Clin Inf Dis.* 14(5): 1149–1158.

Perlman, SJ, Hunter, MS, Zchori-Fein, E. (2006). The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biol Scien.* 273(1598): 2097–2106.

Piranda, EM, Faccini, JL. H, Pinter, A, Saito, TB, Pacheco, RC, Hagiwara, MK, Labruna, MB. (2008). Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: Clinical and laboratory findings. *Mem do Inst Os C.* 103(7): 696–701.

Phongmany, S, Rolain, JM, Phetsouvanh, R, Blacksell, SD, Soukkhaseum, V, Rasachack, B, Newton, PN. (2006). Rickettsial infections and fever, Vientiane, Laos. *Em Inf Dis.*12(2): 256–262.

Ramal, C, Díaz, E, López, J. (2007). Rickettsiosis, enfermedad emergente en Loreto. Evidencia serológica de 20 casos. *Rev Per de Med Exp y Sal Púb.* 24(1): 100–99.

Raoult, D. (1998). Return of the plagues. *The Lan.* 352, S18.

Raoult, D, Roux, V. (1997). Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin microbiol rev.* 10(4): 694–719.

Raoult, D, & Roux, V. (1999). The body louse as a vector of Reemerging human diseases. *Clin Infect Dis.* 29(4): 888–911.

Raoult, D. (2001). A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Inf Dis.* 7(1): 73–81.

Reynolds, M G, Krebs, J W, Comer, J A, Sumner, J W, Rushton, T C, Lopez, C E, Childs, J E. (2003). Flying Squirrel–associated typhus, United States. , *Em Inf Dis.* 9(10): 1341-1343

Roux, V, Fournier, P, Raoult, D. (1996). Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J of clin microbiol.* 34(9): 2058–65.

Roux, V, Rydkina, E, Ereemeeva, M, Raoult, D. (1997). Citrate Synthase gene comparison, a new tool for Phylogenetic analysis, and its application for the *Rickettsiae*. In *J of Syst Bacter.* 47(2): 252–261.

Rovero, C, Brouqui, P, Raoult, D. (2008). Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Em Inf Dis.* 14(9): 1360–1367.

Rutherford, J S, Macaluso, K, Smith, N, Zaki, S R, Paddock, C D, Davis, J, Rosenberg, R (2004). Fatal spotted fever *Rickettsiosis*, Kenya. *Em Inf Dis.* 10(5): 910–913.

Rydkina, E. (1999). New Rickettsiae in ticks collected in territories of the former soviet union. *Em Inf Dis*. 5(6): 811–814.

Rydkina, E, Sahni, A, Silverman, DJ, Sahni, SK. (2002). Rickettsia rickettsii infection of cultured human endothelial cells induces Heme Oxygenase 1 expression. *Infec and Imm*. 70(8): 4045–4052.

Rydkina, E, Turpin, LC, Sahni, SK. (2010). Rickettsia rickettsii infection of human Macrovascular and Microvascular endothelial cells reveals activation of Both common and cell type-specific host response mechanisms. *Inf and Imm*, 78(6): 2599–2606.

Schriefer, M, Sacci, J, Dumler, J, Bullen, M, Azad, A. (1994). Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J of clin microbiol*. 32(4): 949–54.

Sekeyova, Z, Roux, V, Xu, W, Rehacek, J, Raoult, D. (1998). Note: Rickettsia slovaca sp. Nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. *Inter J of Syst Bacter*. 48(4): 1455–1462.

Sekeyova, Z, Roux, V, Raoult, D. (2001). Phylogeny of Rickettsia spp. Inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Inter J of Syst and Evol Microbiol*. 51(4): 1353–1360.

Solary, J, Socolovschi, C, Aubry, C, Brouqui, P, Raoult, D, Parola, P. (2014). Detection of *Rickettsia sibirica mongolitimonae* by using Cutaneous swab samples and quantitative PCR. *Em Inf Dis.* 20(4): 716–718.

Suto, T. (1985). Evidence of spotted fever Rickettsial infection in Japan as demonstrated by the indirect Immunoperoxidase test. *Microbiol and Immun.* 29(12): 1243–1246.

Szabó, MPJ, Pinter, A, Labruna, MB. (2013). Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in brazil. *Front Cell and Infec Microbiol.* 3 (7): 1-9.

Tarasevich, I, Rydkina, E, Raoult, D. (1998). Outbreak of epidemic typhus in Russia. *The Lan.* 352(9134): 1151.

Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. (2001) Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The Vet Rec.* 2001;148 (18):567-72

Thorner, AR, Walker, DH, & Petri, Jr, WA. (1998). Rocky Mountain spotted fever. *Clin Inf Dis.* 27(6): 1353–1359.

Tinoco-Gracia L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martínez MT, Rentería-Evangelista TB, Barreras-Serrano A, Romano-Osuna M, García-Prieto BJ, Escárcega-Ávila AM. (2009). Prevalencia de infestación de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en perros y su asociación de factores de riesgo en la zona urbana de Mexicali, Baja California, México.

VIII Congreso nacional de parasitología veterinaria, 26-28 de octubre de 2009, Mérida, Yucatán, México trabajo 98, pag 242.

Tsai, Y, Wu, Y, Kao, P, Lin, Y. (2008). African tick bite fever. Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi., Formos Med Assoc. 107(1): 73–6.

Tzianabos, T, Anderson, B, McDade, J. (1989). Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. J of clin microbiol. 27(12): 2866–8.

Unsworth, NB. (2007). Flinders island spotted fever Rickettsioses caused by “marmionii” strain of *Rickettsia honei*, eastern Australia. Em Inf Dis. 13(4): 566–573.

Weissmann, G. (2005). Rats, lice, and Zinsser. Em Inf Dis. 11(3): 492–496.

Winkler, H. (1976). Rickettsial permeability. An ADP-ATP transport system. The J of biol chem. 251(2): 389–96.

Walker, DH, Ismail, N. (2008). Emerging and re-emerging rickettsioses: Endothelial cell infection and early disease events: Abstract: Nature reviews microbiology. Nat Rev Microbiol. 6(5): 375–386.

Warner, RD, Marsh, WW. (2002). Rocky Mountain spotted fever. J of the Am Vet Med Ass. 221(10): 1413–1417.

Weinert, LA, Werren, JH, Aebi, A, Stone, GN Jiggins, FM. (2009). Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol*, 7(1): 6.

Xu, Z, Zhu, X, Lu, Q, Li, X, Hu, Y. (2015). Misdiagnosed murine typhus in a patient with multiple cerebral infarctions and hemorrhage: A case report. *BMC Neu*. 15(1): 15:121

Zavala-Castro, JE, Zavala-Velázquez, JE, Walker, DH, Arcila, EER., Laviada-Molina, H, Olano, J P, Dzul-Rosado, :R. (2006). Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii* , Yucatán, Mexico. *Em Inf Dis*. 12(4), 672–674.

Zinsser, H. (1934). studies on typhus fever: xii. the passive immunization of guinea pigs, infected with european virus, with serum of a horse treated with killed rickettsia of the mexican type. *J of Exp Med*. 59(4): 471–478.