

1.- RESUMEN

El tifus murino es una rickettsiosis de distribución mundial . El ciclo biológico principal de esta enfermedad incluye a *Rattus rattus* y *R. norvegicus* y a *Xenopsilla cheopis*. El agente etiológico es *Rickettsia typhi* (Rickettsiales: Rickettsiaceae). Otras especies de roedores y mamíferos pequeños y otras especies de pulgas pueden estar involucrados. En el 2001 se reportaron dos casos de rickettsiosis en Dr. Arroyo, N. L. y en el 2002 el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado llevó a cabo una investigación en Allende y Linares, N. L.; 349 muestras de suero de pacientes sospechosos de dengue, negativos a la técnica de ELISA fueron procesadas por la técnica de IFA, detectándose 17% de positividad a anticuerpos contra *R. typhi*. Debido a que comúnmente se reportan casos de Dengue en el Estado es importante actuar en la búsqueda del patógeno en los hospederos roedores y en sus vectores. Los objetivos generales fueron la detección de anticuerpos y DNA de *R. typhi* en sueros de roedores por IFA y en pulgas por la técnica de PCR. El presente estudio fue realizado en Dr. Arroyo, Allende, Lampazos, Escobedo del estado de Nuevo y en Matamoros, Tamaulipas. Se colectaron un total de 134 roedores y 2 *Didelphys virginianus*. La seroprevalencia por IFA en roedores fue de un 6.71% y en *D. virginianus* no se detectó anticuerpos contra *R. typhi*. La técnica de PCR para determinar la presencia de DNA rickettsial fue negativa para todas las especies de pulgas procesadas. El porcentaje de seroprevalencia en los roedores colectados en Pesqueria (100) y Matamoros (10%) fue mas alto que el de las otras localidades estudiadas. El porcentaje de seroprevalencia total (6.7%) fue bajo comparado con otros estudios realizados en áreas endémicas, sin embargo existe el riesgo de que pudiera ser más alto, si el estudio se lleva a cabo en las estaciones

favorables (otoño y verano), por lo que es importante poner énfasis en el control de los hospederos roedores y vectores.

2.- INTRODUCCION

Las rickettsiosis están distribuidas por todo el mundo y se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: El grupo de tifus: El tifus epidémico y el tifus murino (*Rickettsia prowaseki* y *R. typhi*); el grupo de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (*R. rickettsi*); El grupo del tifus de los Matorrales (*R. tsutsugamuchi*); y un grupo diverso que comprende la fiebre Q (*Coxiella burnetti*) (Prescott, 1999). El tifus murino o tifus endémico es una infección natural en ratas que puede ser transmitida al hombre y se encuentra principalmente en zonas portuarias en todo el mundo (fig. 1). El agente causal es una bacteria gram negativa, intracelular estricta: *Rickettsia typhi* (Rickettsiales:Rickettsiaceae), también denominada *R. mooseri*. La enfermedad del tifus murino puede ser aguda y leve con erupción cutánea y fiebre. Es inhabilitante y puede ser letal en niños y ancianos. Esta enfermedad ha sido vinculada a la presencia de ratas principalmente de las especies *Rattus rattus* y *R. norvegicus* y la pulga *Xenopsylla cheopis* como vector. (Bacellar, 1998)

Se han reportado casos de tifus murino en varias partes del mundo (Fergie, 2000; Zavala, 1996). Los casos reportados en Texas, EE.UU. son importantes para nosotros ya que es un estado que limita al norte de nuestro país. Los síntomas de esta enfermedad pueden confundirse con los de Dengue Clásico, enfermedad endémica en el estado de Nuevo León. Siendo que comúnmente tenemos casos de Dengue y habiéndose reportado dos casos de rickettsiosis en el sur del estado (SSA, 2001), es importante actuar en la búsqueda del patógeno en los hospederos roedores y en sus vectores. En el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado se llevó a cabo una investigación serológica en pacientes con síntomas de Dengue durante el primer trimestre del 2002, en Allende y

Linares, N. L. Estas muestras fueron procesadas por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA), en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Texas. De 349 muestras, el 17% resultaron positivas a *R. typhi*. Esto nos permitió fundamentar la presente investigación que estuvo dirigida a la determinación serológica en roedores por IFA y la detección de la rickettsia en pulgas por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el Noreste de México.

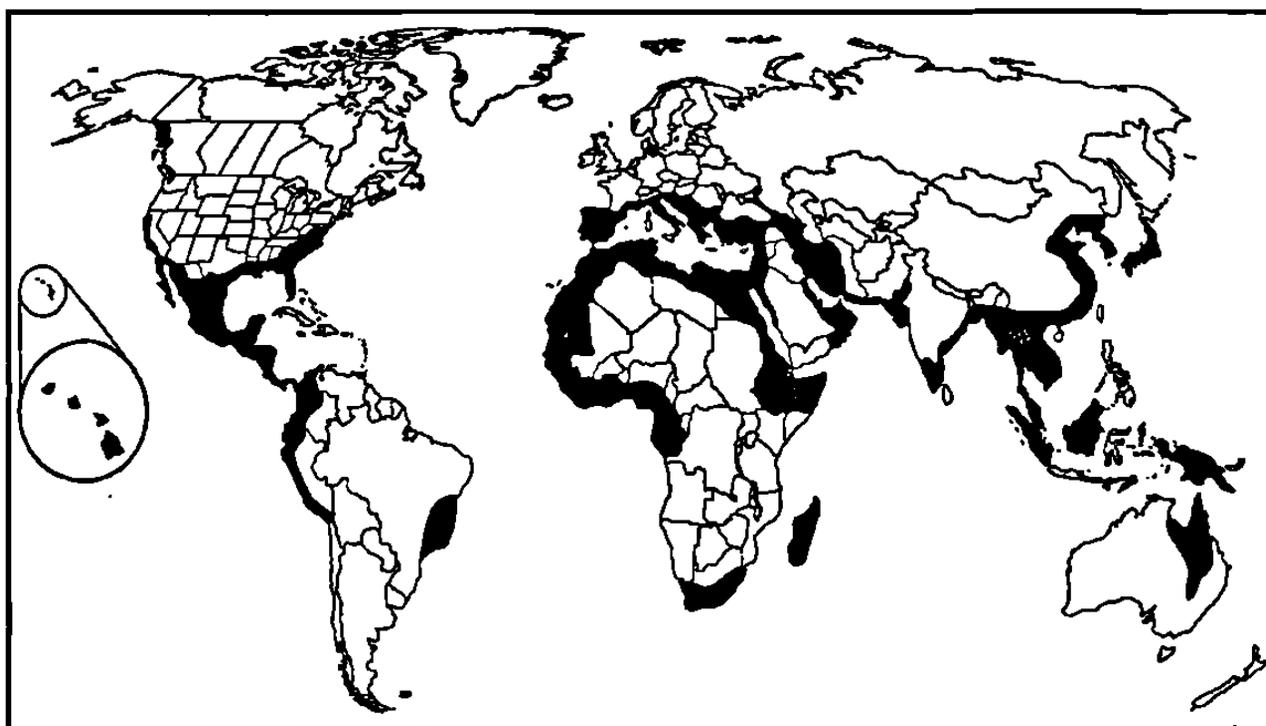


Figura 1. Distribución geográfica del Tifus Murino a nivel mundial.

3.- ANTECEDENTES

3.1.- ORDEN SIPHONAPTERA

Las pulgas son insectos que pertenecen al orden Siphonaptera. Son parásitos hematófagos obligados en la etapa adulta, específicos de especie y que ocasionalmente pueden atacar a otras, incluyendo al hombre. Son aproximadamente 2,000 especies y subespecies. Las pulgas provocan daños al hombre y animales la comezón constante, mantiene al huésped inquieto, el cual deja de comer, no duerme bien y además pierde sangre, que es succionada por las pulgas, ocasionando esto una anemia. Por otra parte la saliva de la pulga tiene una sustancia que provoca una reacción alérgica generalizada en la piel del huésped, aunque este parasitado solamente por una pulga. Estos ectoparásitos pueden transmitir varios patógenos al hospedero como Rickettsias, virus y juegan un papel importante como huéspedes intermediarios de *Dipylidium caninum* (Harwood, 1993).

3.2.- MORFOLOGÍA

El cuerpo de las pulgas esta comprimido lateralmente, por lo tanto, se estudian por sus lados y no dorsalmente, es costumbre proporcionar las descripciones y dibujos de los caracteres exteriores solamente del lado izquierdo (Figura 2). A los caracteres externos pueden agregarse otros internos, como la espermateca. La cabeza se divide en una parte anterior o preantenal y otra posterior o postantenal. El área dorsal de la porción preantenal se denomina frente. El borde de la frente de muchas pulgas presenta una pequeña proyección triangular, el tubérculo frontal, cuya forma y estructura varia en las diferentes

especies. El área ventral de la preantena de la cabeza es la gena, que puede llevar un peine de espinas, el ctenidio genal. Este puede estar presente a lo largo del área marginal ventral de la gena y entonces se le denomina ctenidio horizontal o encontrarse a lo largo del área marginal posterior de la gena, llamándose entonces ctenidio oblicuo o vertical. Puede haber ojos aunque algunas veces están atrofiados o no existen. La cerda colocada más cerca del ojo, debajo o enfrente de él, es la cerda ocular. Las antenas están situadas en las fosas de las antenas, una a cada lado de la cabeza. Cada antena está formada por un escapo bien desarrollado (primer segmento), un pedicelo más pequeño (segundo segmento) y de una clava (maza). Las antenas de casi todas las pulgas muestran dimorfismo sexual. Las de los machos son más grandes que la de las hembras y se encuentran cubiertas densamente por el lado interno de la clava con microcerdas adaptadas para sujetar a la hembra durante la copula cuando están erectas. Toda el área postantenal de la cabeza se denomina occipicio. Los órganos bucales consisten del labro que es un esclerito pequeño y carece de importancia taxonomica.; una epifaringe; un par de maxilas, consistiendo cada una de un estipo que generalmente es triangular y lleva el palpo maxilar, el cual está formado por cuatro segmentos y una lacinia que tiene bordes finos o toscamente dentados y es tan larga como la epifaringe; ésta y las dos lacinias forman juntas el tubo perforante chupador. El labio, del que solamente los palpos labiales tienen importancia taxonómica; generalmente constan de cinco segmentos, aunque este número puede reducirse a dos rara vez excede de cinco. El torax consta de tres segmentos, protórax, mesotórax y metatórax, cada uno de los cuales tiene un esclerito dorsal o noto y un pleuroesterno ventral. El noto del protórax se denomina pronoto y el de mesotorax mesonoto. El pronoto de muchas especies lleva un peine llamado Ctenidio pronotal. Cada segmento torácico lleva un par de patas que están divididas en coxa, trocanter, fémur y un tarso que consta de cinco segmentos. El abdomen

consta de diez segmentos, donde cada segmento esta formado por un esclerito dorsal, el tergo y un esclerito ventral, el esterno, exepcto el primer segemento que carece de esterno. Los primeros siete segmentos son pregenitales, Los segmentos VIII y IX son segmentos genitales y el X es el segmento anal. El aparato genital del macho generalmente se denomina aedeago, la mayoria de las pulgas pueden identificarse sin recurrir a el. La parte mas importante de los genitales femeninos es la spermateca, la cual es caracteristica de la especie (Lapage,1984).

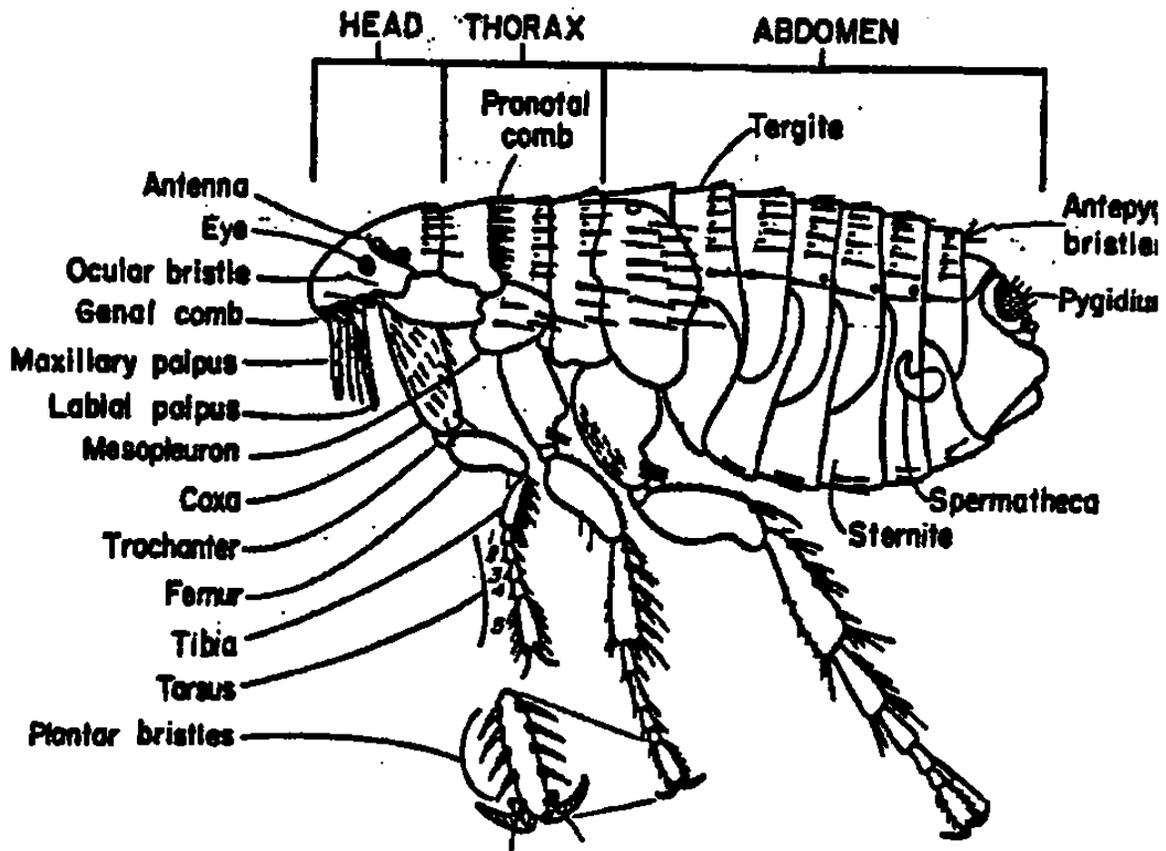


Figura 2. Morfología de una pulga

3.3.- CICLO DE VIDA DE LA PULGA.

La mayoría de las pulgas requiere de 30-75 días para completar su ciclo de vida (figura 3). La pulga adulta se encuentra permanentemente sobre su huésped donde se alimenta, reproduce y causa daño. Sobre el huésped el macho fertiliza a la hembra, ambos se alimentan de la sangre del huésped y dos días después la hembra empieza a ovipositar de 3 a 18 huevecillos en una sola oviposición y hasta 450 en 196 días. Una pulga adulta llega a medir entre 4 y 6 mm de longitud , son de color café ocre y poseen estructuras especiales que las sujetan del pelo de los animales. Estos insectos llegan a consumir 20 veces su peso en sangre. Los huevecillos poseen una cubierta lisa nacarada y libre de sustancias pegajosas, lo que favorece su diseminación en el medio ambiente, ya que no pueden ser contenidos entre los pelos del animal, se dispersan sobre muebles, alfombras y demás objetos por donde transitan los animales portadores. El huevecillo mide 0.5mm de diámetro, son de color blanco y en condiciones favorables tardan de 2 a 8 días en incubarse y eclosionar, liberando así una larva. Después de transcurrida la liberación de los huevecillos, las larvas son liberadas al medio ambiente, estas presentan una característica muy peculiar, que aunque carecen de órganos visuales, reaccionan a la luz en forma negativa y buscan los lugares oscuros, secos y difíciles de ser alcanzados por los animales, otros insectos y el hombre. Estos lugares son rendijas, hendiduras, bajo alfombras, pliegues, etc., donde la larva permanecerá hasta alcanzar la madurez. Al salir del huevecillo las larvas son blancas, transparentes y miden aproximadamente 4 mm de longitud, se alimentan de la sangre digerida de las pulgas adultas, detritus de piel y pelo del huésped, heces e impurezas del ambiente durante 8 días donde cambia de color blanco a rosado/ocre y crece hasta 8 mm. La ultima etapa inmadura de estos insectos son las pupas, ahí las larvas sufren una transformación a adulto. Las pupas miden de 0.4 a 0.5 mm de longitud. Esta

etapa puede durar 7 días o hasta un año antes de liberar una pulga desarrollada de tres pares de patas. Aunado a la temperatura (19 a 29° C) y a la humedad (70 - 75%). Los estímulos del medio ambiente, en particular las vibraciones producidas por el andar del hospedero, son las causas que generan la ruptura del capullo y la liberación de la pulga que buscara a su huésped para iniciar un nuevo ciclo El adulto no emerge de la pupa sin estos estímulos (Hull, 1981).

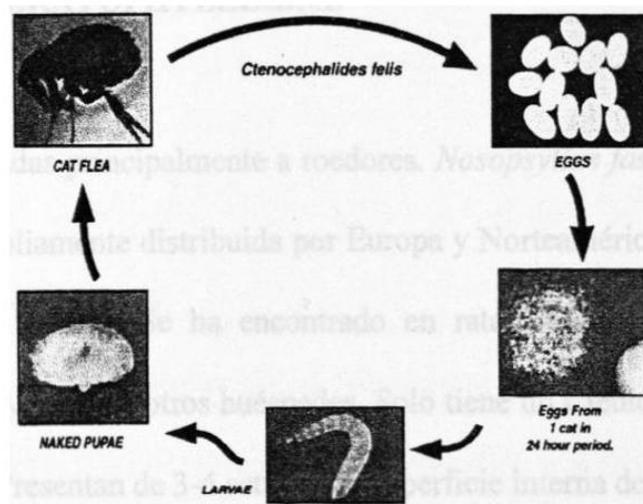


Figura 3. Ciclo de vida de *Ctenocephalides felix*

Es importante mencionar que las fases que se ven afectadas por la aplicación de productos insecticidas son los huevecillos, las larvas y las pulgas adultas. Aunque las pulgas han convivido con sus hospederos desde hace siglos y se han intentado múltiples

formas para controlarlas, en nuestros días son una plaga que han crecido en forma impresionante, no solo en países en desarrollo, sino también en países altamente desarrollados, como son los EE.UU. y países europeos, y lo anterior se debe al estrecho contacto que los hospederos de las pulgas tienen con el hombre pues cohabitan en las mismas habitaciones, en donde se crean las condiciones de temperatura y protección para estos (Bayer,1999).

3.4.-ESPECIES COMUNES DE PULGAS

3.4.1.- FAMILIA CERATOPHYLLIDAE

Pulgas asociadas principalmente a roedores. *Nosopsyllus fasciatus* (“ northern rat flea”) (fig. 4), ampliamente distribuida por Europa y Norteamérica, siendo menos común en otras partes del mundo. Se ha encontrado en ratas ratones domésticos, geómidos, zorrillos, el hombre y muchos otros huéspedes. Solo tiene un Ctenidio pronotal con un total de 18 a 20 espinas. Presentan de 3-4 setas en la superficie interna del fémur posterior.



Figura 4. *Nosopsyllus fasciatus*

3.4.2.- FAMILIA LEPTOSYLLIDAE.

Leptosylla segnis ("European mouse flea") (Fig. 5) es la pulga cosmopolita de los ratones y común en las ratas. Rara vez pica al hombre.

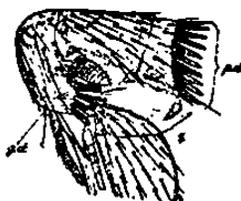


Figura 5. *Leptosylla segnis*

3.4.3.- FAMILIA PULICIDAE

Esta familia incluye a varias plagas importantes para el hombre, aves domesticas y mascotas, asi como a vectores importantes del patógeno de la peste y supuestos vectores del tifus murino o humanos. *Pulex irritans* (Fig. 6) , la pulga del hombre tiene una distribución cosmopolita y se encuentra sobre varios hospederos, incluyendo animales de granja. No presenta ctenidios orales o pronotales, las metacoxas tienen una hilera de espinulas cortas en la parte interna. Las lacinias maxilares se extienden hasta la mitad de las coxas anteriores.



Figura 6 . *Pulex irritans*

Echidnophaga gallinacea se parece a *Tunga penetrans* en la reducción de los segmentos torácicos, difiere por tener los ángulos de la cabeza proyectados en forma aguda. Es una plaga seria de las aves domésticas.

Ctenocephalide canis y *Ctenocephalids felis* (fig. 7 y 8) son las pulgas del perro y el gato respectivamente. Ambas especies atacan a perros y gatos así como al hombre. *C. felis* esta involucrada en el tifus murino .En Nortamérica *C. felis* es mas común que *C. Canis*. El ctenidio oral de ambas especies consta de 7-8 dientecillos. En *C. felis* la primera y segunda espina genales son de la misma longitud tanto que en *C. canis* la primera es mas corta que la segunda espina. El ctenidio pronotal de *C. felis* tiene aproximadamente 16 dientecillos mientras que *C. canis* tiene 18.



Figura 7. *C. canis*

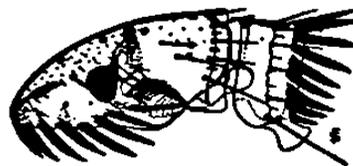


Figura 8 . *C. felis*

Xenopsylla cheopis (“Oriental rat Flea”) (Fig. 9) es cosmopolita especialmente donde se encuentra *Rattus rattus*, se encuentra en los edificios y pica libremente al hombre. Es vector de enfermedades como la peste y el tifus murino. Se parece a *P. irritans* en la ausencia de ctenidios.

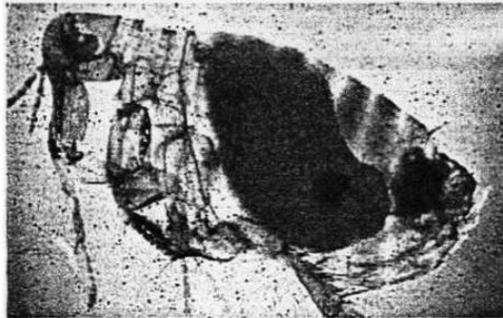


Figura 9 . *Xenopsylla cheopis*

3.4.4.- FAMILIA TUNGIDAE

Estas pulgas están especialmente adaptadas para la adhesión intra cutánea permanente en los huéspedes. *Tunga penetrans*, esta pulga tiene la cabeza angular y proporcionalmente mas grande que la cabeza de otras pulgas. No presentan ctenidios y las partes bucales son conspicuas; los palpos constan de cuatro artejos. Cuando la hembra esta inseminada se introduce en la piel del huésped, entre los dedos del pie o debajo de las uñas y debajo del pie, aunque ninguna parte del cuerpo esta exenta de su ataque. Es una especie de las partes tropicales y subtropicales de América, Indias Occidentales y África.

3.5.- OTRAS ESPECIES IMPLICADAS COMO VECTORES

El vector principal del tifus murino es la pulga de la rata y ratones (*Xenopsylla cheopis*), aunque también se han visto involucradas las pulgas de los gatos, (*Ctenocephalides felis*). *Xenopsylla cheopis* fácilmente deja a su huésped y puede transferirse a otros huéspedes de la misma especie o de otra, por lo que es común encontrarlos en gatos y perros. La falta de especificidad absoluta de estas pulgas aumenta su potencial en la transmisión de patógenos. Para estudios entomológicos se deberá buscar pulgas de animales que conviven con el hombre señalando los índices de infestación por especies y por hospedero (NOM, 1999).

Otras especies de pulgas diferentes implicadas como vectores, en diferentes grados de tifo murino son: *Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Leptosylla segnis*, *Echidnopaga gallinacea*, *Nosopsyllus fasciatus* y *Monopsyllus anisus*. La transmisión de roedor a roedor ocurre por *Poliplax spinulosa* y *Hoplopleura sp.*, y el acaro *Ornithonyssus bacoti*. (Traub, 1980).

Poliplax spinulosa y *Hoplopleura sp.*, están incluidas según Ferris dentro de la familia Polyplacidae y Hoplopleuridae respectivamente, son parásitos de roedores que pueden estar relacionados con la transferencia de vector a vector de patógenos que atacan al hombre y animales, como los de la Tularemia y los del Tifus Murino (Harwood, 1993).

Poliplax spinulosa (fig. 10), se caracteriza por la placa esternal torácica posteriormente en forma de punta, con márgenes laterales paralelos; en el margen posterior de los paraterguitos de los segmentos abdominales del 3-6, cada uno presenta un par de

setas paratergales cortas y robustas, mas cortas que la placa paratergal. La longitud del cuerpo de la hembra es de 1.3 mm y del macho 0.96 mm aproximadamente. Los hospederos principalmente *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*. La distribución geográfica de esta especie es por todo el mundo. Se ha encontrado en Estados Unidos en : Alabama, Arkansas, California, Colorado, District of Columbia, Florida, Georgia, Illinois, Iowa, Kansas, Kentucky, Louisiana, Massachussets, Michigan, Mississippi, Missouri, New Hampshire, New Jersey, New York, North Carolina, Ohio. Oklahoma, Rhode Island, South Carolina, Tenessee, Texas, Utah, Virginia y Wyoming.

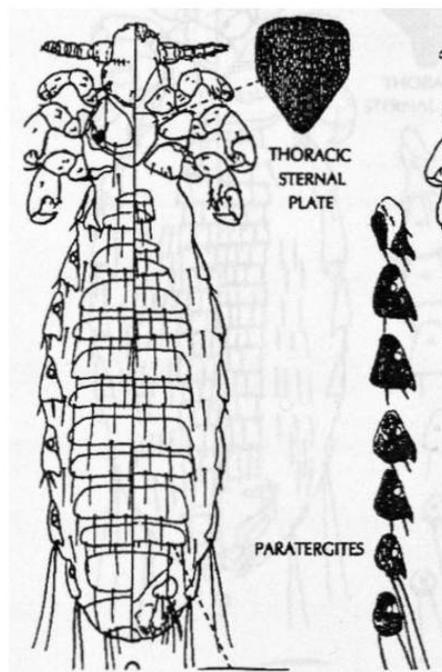


Figura 10 .Poliplax spinulosa:

El género *Hoplopleura* (fig. 11) se caracteriza por las placas esternales tansversas de los segmentos 2 y 3 que atraviesan la superficie ventral y están articuladas con las placas paratergales. Asi como por los dos grupos de dos o tres setas alargadas que se encuentran en la placa esernal del segmento 3 al 7; la hembra con una o dos hileras de setas dorsal y ventralmente en los segmentos del 3 al 7. los hospederos principales son de la familia Muridae y Cricetidae, también se han encontrado en Sciuridae y otros roedores. Su distribución principalmente en Norteamérica (Chung, 1986).

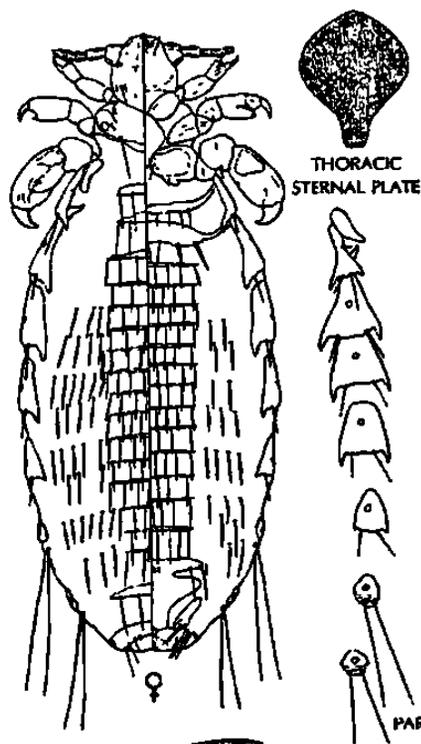


Figura 11 . *Hoplopleura* sp.

3.6.- HOSPEDEROS ROEDORES DE *R. typhi*

La característica sobresaliente de los roedores es la adaptación de los dientes. La mandíbula superior e inferior tienen cada una de ellas un par de incisivos los cuales están en crecimiento constante; son muy largos siendo una efectiva herramienta para cortar. Los roedores pueden retraer el costado de los labios hacia el interior, facilitándoles así el cavar y roer con los incisivos sin tragar tierra o astillarse con madera u otro material su boca. Los roedores constituyen el orden más grande de los mamíferos con cerca de 1,700 especies en 35 familias que incluyen 389 géneros, sin embargo menos de 100 de estas especies son importantes como plaga. Los roedores plaga pertenecen principalmente a las familias Sciuridae (ardillas terrestres y de árboles), Cricetidae (hámsters, ratón de campo y jerbos) y Muridae (ratas y ratones). Los ratones comensales o urbanos pertenecen a la familia Muridae y son los de mayor interés económico; presentan características adaptativas que las hacen ser los principales competidores del hombre por diferentes productos agropecuarios, alimentos y materiales diversos, así como por el espacio. Debido a su distribución, daño que causan, adaptabilidad e importancia en salud pública, las tres especies de roedores comensales más importantes económicamente en México son *Rattus norvegicus*, *R. rattus* y *Mus musculus*, especies que han acompañado al hombre desde hace cientos de años y pertenecen al orden Rodentia y a la familia Muridae .

Muridae (ratones, ratas de campo y casera). Las especies de roedores de esta familia tienen el pelo del dorso y los costados con la base gris, una banda subterminal en tono café o amarillento y la terminal oscura, la anchura de estas bandas y su coloración, es lo que identifica a la mayoría de esta familia. Comúnmente es más oscuro en la parte dorsal

media; en algunas especies hay una línea lateral que contrasta con el vientre y los costados . Las especies de *Peromyscus*, *Onychomys* y *Neotoma* tienen sus miembros y sus partes ventrales blancas y la cola bicolor. Cola corta a muy larga, peluda o escamosa. Los molares varían de corona baja enraizados a corona alta y de crecimiento continuo, la superficie oclusal plana o con tubérculos arreglados en dos o tres hileras longitudinales; usualmente los nasales extendidos mas allá de los incisivos; canal infraorbital moderado, en forma de “V”. *R. norvegicus*, *Rattus rattus* y *Mus musculus* son especies que han sido introducidas a Norteamérica.

R. norvegicus (fig. 12),rata noruega gris de las alcantarillas. De origen asiático rata grande de cuerpo grueso y hocico achatado; mide de 20 a 27 cm. Cola de aspecto escamoso y desnuda de 16 a 23 cm de largo. Ojos y orejas pequeñas. Color del cuerpo variable y vientre gris. Peso de 200 a 300 gr o mas. Vive en alcantarillas y areas de exteriores cerca de núcleos urbanos. Es cosmopolita. Alimentación omnívora. De 3 a 5 camadas por año, de 5 a 12 crías por parto, gestación de 24 días, madura a los 2.5 a 3 meses de edad. Ataca cualquier tipo de instalación o cultivo.

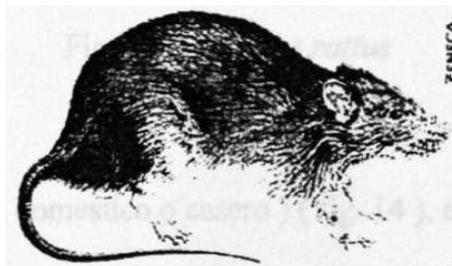


Figura 12. *Rattus norvegicus*

Rattus rattus (fig. 13) es originaria del Sudeste de Asia. Rata mediana de cuerpo esbelto, cara afilada y de orejas grandes. Mide de 16 a 23 cm. Cola muy larga y desnuda, de color café pardo a negra. Peso de 150 a 200 gr. Vive en cualquier lugar como hueco de árboles o edificios. generalmente es cosmopolita; habita en zonas tropicales y subtropicales, particularmente en áreas húmedas. Se alimentan de plantas verdes, semillas e insectos. Ataca zonas con cultivos ya establecidos, zonas de almacenes y graneros.

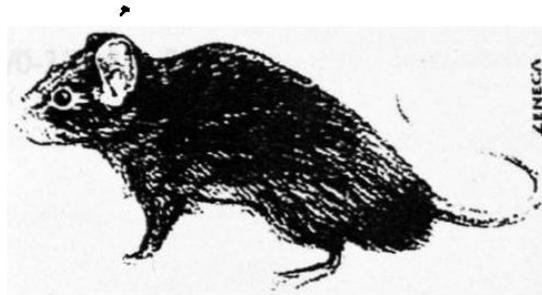


Figura 13 . *Rattus rattus*

Mus musculus (ratón domestico o casero) (fig. 14), es originario de Asia central. Cuerpo pequeño y delgado, orejas grandes. Mide de 8 a 10 cm. Cola larga y anillada. Peso de 10 a 25 gr. Es cosmopolita, vive en zonas arbustivas y núcleos urbanos. Se alimenta de semillas, hierbas y algunas ocasiones insectos. De 6 a 10 camadas por año, de 5 a 8 crías por parto. Madura sexualmente a las 6 semanas. Muy destructor en almacenes de granos y cultivos de cereales (Porres, 1998).



Figura 14 . *Mus musculus*

Peromyscus maniculatus (fig. 15), se caracteriza por el dorso café claro, vientre blanco la base del pelo gris, cola bicolor. *Peromyscus* de menor tamaño, cola corta. Formula dentaria: $1/1-0/0-0/0-3/3=4/4 \times 2=16$.



Figura 15. *Peromyscus maniculatus*

Peromyscus leucopus (fig. 16), presenta color variable, gris cuerno opaco, arcilla oscuro y el mas florido, el canela. Porción media del dorso mas oscura. Patas blancas. Longitud total no mas de 200 mm. Longitud igual a la cabeza y el cuerpo. Pesa 17-20 gr; estos últimos dos caracteres lo diferencian de las demás especies. Formula dentaria: 1/1-0/0-0/0-3/3=4/4x2=10.

Sigmodon hispidus (fig. 17), el pelo de protección termina en negro y el pelo de cobertura amarillo. En general el color de pelo es amarillo mostaza o ante; con vientre grisáceo. La superficie oclusal de los molares en forma de "S" y el pelo hirsuto (hispido) que dan nombre a la especie. Longitud total 192 – 287 mm, cola menor en longitud que la cabeza y el cuerpo, desnuda, con anillos de escamas ; orejas redondeadas. Formula dentaria: 1/1-0/0-0/0-3/3=4/4x2=6.



Figura 17 . *Sigmodon hispidus*

Aparte de la familia Muridae, Heteromyidae es una de las principales familias de roedores presentes en el Noreste de México. Heteromyidae (Heteromidos, Ratas canguro), se caracterizan por la presencia d abrazones, estructuras en forma de saco, trasladan su alimento desde el sitio de recolección hasta la madriguera. Miembros traseros largos, craneo frágil; anchura interorbitaria mayor que la rostral; los nasales se proyectan mas allá de los incisivos; bula timpanica y mastoides inflados y forman parte de la superficie dorsal del cráneo, formula dentaria: 1/1- 0/0-1/1-3/3=5/5x2=20. la mayoría de los miembros de esta familia estan adaptados a ecosistemas semiáridos y su distribución esta concentrada hacia Norteamérica, para México la parte que corresponde al Altiplano Mexicano. Algunas especies son parecidas a ratas caseras, mientras otros son altamente especializados para la locomoción saltatorial. Las semillas son su principal fuente de alimento (Barragán, 2002).

3.7.- BIOLOGIA DE RICKETTSIAS Y PRINCIPALES ENFERMEDADES QUE CAUSAN

Las rickettsias son bacterias de crecimiento exigente, parásitos intracelulares obligados (Fig. 18). Son coco bacilos pleomorfos, miden de 0.3- 0.5 x 0.8- 2.0µm. Se mantienen en el ambiente a través de un ciclo en el que participan mamíferos como reservorio e insectos como vectores.

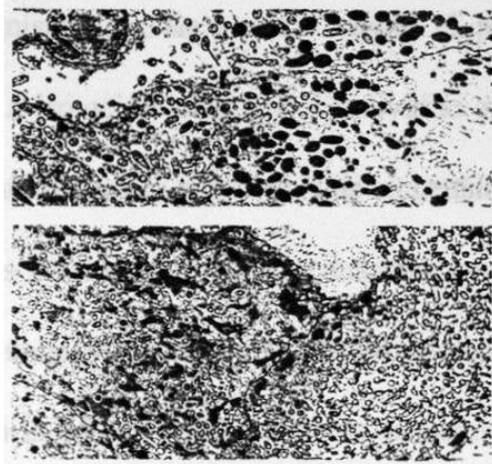


Figura 18 . Rickettsias en células epiteliales del intestino medio de una pulga.

En la primera edición del manual Bergey, las rickettsias se dividen en cuatro grupos basados en las características como su localización intracelular, la temperatura óptima de crecimiento, propiedades antigénicas, composición de su DNA (% de mol d e G y C) y las enfermedades que provocan. Estos grupos son: 1) El grupo de tifus: tifus epidémico (*Rickettsia prowaseki*) y tifus murino (*R. tiphy*). 2) El grupo de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (*R. rickettsi*). 3) El grupo del tifus de los matorrales (*R. tsutsugamuchi*) y 4) un grupo diverso que comprende la fiebre Q (*Coxiella burnetii*). Rickettsia y Erlichia pertenecen el orden Rickettsiales de las α – proteobacterias; Coxiella se encuentra en las γ -proteobacterias, todas de la familia Rickettsiaceae (Prescott,1999).

3.7.1.- TIFUS EPIDEMICO. El agente etiológico del tifus epidémico o exantemático, es *R. prowasekii* y se trasmite de una persona a otra por el piojo del cuerpo *Pediculus humanus corpori*. En los E. U. existe un reservorio de *R. prowasekii* en la ardilla voladora del sur. Cuando un piojo chupa la sangre de una persona infectada, las rickettsias infectan

el intestino del piojo y se multiplican, y aproximadamente en una semana aparecen grandes cantidades de microorganismos en las heces. Cuando el piojo chupa la sangre de otro individuo sano, defeca. La irritación hace que el individuo afectado se rasque y contamine de rickettsias el lugar dañado por la picadura. Las rickettsias se propagan por el torrente sanguíneo, infectando las células endoteliales causando una vasculitis. Esta produce una cefalea brusca, fiebre y mialgias. Aparece un exantema en la parte superior del tronco que se extiende. Sin tratamiento la recuperación tarda dos semanas, siendo la tasa de mortalidad muy elevadas sobre todo en ancianos. La recuperación de la enfermedad confiere una inmunidad enérgica que también protege a la persona contra el tifus murino. En los E.U. se notifican anualmente menos de 25 casos de tifus epidémico.

3.7.2.- TIFUS MURINO

El agente etiológico del tifus murino o endémico es *R. typhi*. Se da en zonas aisladas de todo el mundo, incluyendo los estados del sudeste de Estados Unidos y de la costa del golfo, especialmente en Texas. La enfermedad aparece en forma esporádica en individuos que entran en contacto con roedores y sus pulgas (*Xenopsilla cheopis*). La enfermedad no resulta mortal en el roedor y se transmite de un roedor a otro por las pulgas. Cuando una pulga infectada chupa la sangre de un humano, defeca. Sus heces están atestadas de rickettsias. Que infectan a los seres humanos al contaminar la picadura. Las manifestaciones clínicas del tifus murino, son similares a las del tifus epidémico, solo que más leves y su tasa de mortalidad es mucho menor, inferior al 5%. Anualmente se notifican menos de 100 casos de tifus endémico en los Estados Unidos (Prescott,1999).

3.7.3- FIEBRE MANCHADA DE LAS MONTAÑAS ROCOSAS

Es causada por *R. rickettsi*. aunque se detectó por primera vez en la zona de las Montañas Rocosas de Estados Unidos, la mayoría de casos de esta enfermedad se produce en la actualidad al este del río Mississippi. La enfermedad se transmite por garrapatas y suele aparecer en personas que se encuentran o han estado en zonas infestadas por garrapatas. Existen dos vectores principales: *Dermacentor andersoni*, la garrapata de los bosques, distribuida por los estados de las Montañas Rocosas y activa durante la primavera y el principio del verano. *D. variabilis* la garrapata del perro que ha asumido una importancia mayor y esta confinada de forma casi exclusiva a la mitad oriental de los Estados Unidos. A diferencia de las otras rickettsias, *R. rickettsi* puede pasar de generación en generación de garrapatas a través de sus huevecillos (transmisión transovarica). No son necesarios los mamíferos para mantener la propagación de esta rickettsia en el ambiente. Cuando los seres humanos entran en contacto con la garrapatas infectadas las rickettsias pueden depositarse en la piel y después al rascarse o frotarse se introducen en la piel bien se depositan en el interior de la piel en el momento de la picadura. Una vez dentro de la piel las rickettsias entran en las células endoteliales de los pequeños vasos sanguíneos, donde se multiplican causando una vasculitis característica. La enfermedad se caracteriza por cefalea, fiebre alta, escalofríos y un exantema cutáneo que aparece primeramente en las muñecas y tobillos y posteriormente se extiende al tronco. Si la enfermedad no se trata las rickettsias pueden destruir los vasos sanguíneos del corazón, riñones o pulmones y provocar la muerte. Aproximadamente se notifican 1,000 casos anuales de fiebre manchada de las montañas rocosas en los Estados Unidos (Kelley, 1990 ; Prescott,1999).

3.8.- CASOS REPORTADOS DE TIFUS MURINO Y OTRAS RICKETTSIOSIS

Ricketts, viajó a México para estudiar el tifo mexicano, descubrió que un microorganismo similar al bacilo de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas podía causar la enfermedad en monos y que se transmitía por piojos, a pesar de su cuidadosa técnica sufrió una picadura mientras transfería piojos en su laboratorio y murió de tifus el 3 de mayo de 1910. El agente causal del tifus epidémico fue descrito por completo por el científico brasileño H. Da Roche-Lima y denominado en honor de Ricketts y de Stanislaus von Prowasek, microbiólogo checoslovaco que murió en 1915 mientras estudiaba el tifus. En la actualidad las campanas de flujo laminar han reducido notablemente los riesgos de investigar patógenos microbianos (Prescott,1999).

En Estados Unidos se piensa que las ratas que se encuentran en granjas dispersas son los reservorios mas importantes del tifo murino endémico, ya que desde 1943 la mayoría de los casos en el hombre se han presentado en las regiones rurales y se ha observado que la incidencia mensual de anticuerpos contra *R. typhi* en las ratas *R. norvegicus* y *R. rattus* tenían correlación estrecha con *X. cheopis* (Smith, 1957 citado por Harwood, 1993).

En 1947, fue reportada *R. typhi* en la Republica Mexicana en los estados de Guerrero, Hidalgo, v Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Tamaulipas y Zacatecas (Zavala,1996). Entre los años de 1980 a 1998 fueron reportados en Texas de 92 a 72 casos de tifus murino endémico por año (Fergie, 2000).

La Secretaria de Salud reportó en Dr. Arroyo, Nuevo León dos casos de rickettsiosis (SSA,2001).

Un trabajo similar a este, fue realizado en Grecia donde se estudió la prevalencia de anticuerpos contra *R. typhi* en 54 sueros de roedores (53 *Rattus rattus* y 1 *Mus musculus*) por la técnica de IFA y la presencia de DNA rickettsial en 226 pulgas (*Xenopsylla cheopis*) por PCR. La prevalencia de anticuerpos obtenidos en roedores fue del 90% y en pulgas del 3.5 % (Chaniotis, 1994).

Existe un ciclo del tifus murino alternativo que involucra a *Didelphys virginianus* y *Ctenocephalides felis*, algo interesante es el descubrimiento de la asociación existente entre *R. felis* , *C. felis* y *D. virginianus* y este ciclo. (fig. 19). Se realizó una investigación por la técnica de IFA en *Didelphys virginianus* infectados con *R. felis* y casos de tifus murino humano en Texas; observándose una relación estrecha (*R. felis* 22%; *R. typhi* 8%). En este estudio se encontró que de 529 pulgas (*Ctenocephalides felis*) 2.6% estaban infectadas con rickettsias (3 *R. typhi* y 11*R. felis*). La presencia de *R. felis* se ha confundido como fiebre de dengue, esta documentado en pacientes de Yucatan , Brazil y Francia. (Boostrom, 2002; Bouyer,2001).



Figura 19 . Ciclo alternativo de tifus murino: *Didelphys virginianus* y *Ctenocephalides felis*

3.9.- TECNICAS PARA DETECTAR *R. typhi* EN HOSPEDEROS Y VECTORES

3.9.1.- TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

El microscopio de fluorescencia y los conjugados de anticuerpos fluorescentes específicos son muy útiles cuando se dificulta la observación directa del patógeno como es en el caso de rickettsias. La inmunofluorescencia es un proceso en el cual unos colorantes llamados fluorocromos se exponen a la luz UV, para provocar en ello fluorescencia y que emitan luz visible. Los colorantes como la rodamina B o el isotiocianato de fluoresceína se pueden unir a moléculas de anticuerpo sin modificarle la capacidad de unirse al antígeno específico. Existen dos tipos de pruebas con anticuerpos fluorescentes: directa e indirecta.

3.9.2.- INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Esta técnica implica fijar en un portaobjetos la muestra que tiene el antígeno de interés, después se añade al portaobjetos anticuerpos marcados con fluoresceína y se incuban. Se lava el portaobjetos para quitar el anticuerpo no unido y se examina con el microscopio de fluorescencia buscando una fluorescencia amarilla verdosa. El patrón de la fluorescencia revela la localización del antígeno. Esta prueba se utiliza para identificar antígenos como los que se encuentran en la superficie de los estreptococos del grupo A y para diagnosticar *Escherichia coli* enteropatógena, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocitogenes*, *Haemophilus influenzae*, virus de la rabia y Rickettsias entre otras.

3.9.3.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Esta técnica se emplea para detectar la presencia de anticuerpos en el suero. En esta técnica se fija un antígeno conocido en un portaobjetos. Después se añade el antisuero de prueba, y si esta presente el anticuerpo específico , reacciona con el antígeno para formar un complejo. Cuando se añade antiinmunoglobulina marcada con fluoresceína, reacciona con el anticuerpo fijado. Después de la incubación y del lavado se examina el portaobjetos con el microscopio de fluorescencia. La presencia de fluorescencia indica que en el suero existe anticuerpo específico contra el antígeno de prueba. Esta técnica se emplea para detectar la presencia de anticuerpos frente a *Trepomema pallidum* en el diagnostico de la sífilis así como anticuerpos producidos en respuesta contra otros microorganismos (Kart, 1998).

3.9.4.- TÉCNICA DE PCR.

El proceso de PCR fue ideado en 1985 por el investigador Karry B. Mullis, en California, Estados Unidos. PCR es un proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso. En general, los componentes requeridos para un PCR son: DNA, iniciadores (oligonucleotidos) específicos que flanquean el gen o el fragmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleotidos (dNTP's), solución amortiguadora de reacción y DNA polimerasa. Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son: 1)

Desnaturalización (92-98, 30 a 90 ´´), en el cual se separan o las dos cadenas complementarias del DNA blanco. 2) Alineamiento (50-60 ° C, 30-60 ´´), en el que se realiza apareamiento específico entre los indicadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado. 3) Extensión (70-74 ° C, 30-90 ´´), en el que el DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA blanco, al ir polimerizando los desoxinucleotidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción. El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de la reacción pero contiene ahora el doble de cadenas sencillas de DNA blanco que el anterior y finaliza convirtiendo estas en cadenas dobles. Al finalizar la reacción hay millones de copias del fragmento de interés, por lo que es suficiente colocar en un gel de agarosa una décima parte del volumen total de la reacción, correr la electroforesis y teñir con bromuro de etidio para poder verificar el éxito de la amplificación. El análisis fino se realiza siguiendo metodologías elegidas para cada caso en particular, como puede ser: electroforesis en gel de poliacrilamida; digestiones con enzimas de restricción seguidas por electroforesis en gel, y la confirmación de la identidad del producto de PCR mediante hibridación con sondas, secuenciación nucleotida, etc. (Dieffenbach, 1995).

El diagnóstico de laboratorio para tifus epidémico (*R. Prowasekii*) y tifus murino (*R. typhi*) esta basado en reacciones serológicas. El método de referencia es la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA), pero las pruebas de Weil – Felix, ELISA, inmunoperoxidasa, aglutinación en latex, dot blot y Westernblott también son usadas (La Scola, 2000).

Existen otras técnicas para la detección de Rickettsias como las utilizadas en los siguientes casos:

Estudios realizados por PCR en 399 pulgas (*Ctenocephalides felis*), revelaron un rango de infección del 3.8% para el agente ELB (*Rickettsia* muy parecida a *R. typhi*) y 0.8% para *R. typhi*. Se realizó la técnica de IFA a 9 sueros de *Didelphys virginianus* y 3 mostraron infección por el agente ELB. Los resultados sugieren que el agente ELB esta involucrado en el ciclo de tifus murino por encontrarse esta *Rickettsia* en vectores y hospederos reservorios (Schriefer, 1994).

Se compararon las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFA), aglutinación en latex (LA), dot- ELISA, y Weil –Felix (WF). Dot-ELISA y LA requirieron menos tiempo de procesamiento y equipo por lo que se sugirieron para ser utilizadas en el diagnostico de tifus murino en hospitales rurales pequeños en Tailandia (Silpapojakul, 1995).

La técnica de IFA es considerada como una técnica para determinar seroprevalencia de enfermedades rickettsiales. Westernblott es probablemente la técnica mas especifica para determinar la prevalencia real (prueba confirmatoria) de dichas enfermedades (La Scola,1997).

Se estudio seroprevalencia para *Rickettsias* del grupo de *R. typhi* y para el grupo de *Coxiella burnetii* por la técnica de IFA, en un área urbana del este de Africa (Dar es Salaam, Tanzania), en 150 mujeres embarazadas de diferentes edades; presentándose el mayor porcentaje de seropositividad en las mujeres de 30-34 para *R. typhi* (46%), de 16-19 años para *R conorii* (36%) y en mujeres de 30-34 años para *C. burnetii* (15%) (Anstey,1997).

4.- JUSTIFICACION

Siendo que comúnmente tenemos casos de Dengue y habiéndose reportado dos casos confirmados de rickettsiosis en el sur del estado, es importante actuar en la búsqueda del patógeno en los hospederos roedores y en sus vectores.

5.- ORIGINALIDAD

Este será el primer trabajo realizado en la detección de anticuerpos contra *R. typhi* y DNA rickettsial en hospederos y vectores en el noreste de México.

6.- HIPOTESIS

Nuestra hipótesis planteada es que existe una relación directa entre los roedores seropositivos, hospederos naturales de *R. typhi* y las pulgas que actúan como vectores.

7.- OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia a *R. typhi* en roedores y la presencia de DNA rickettsial en pulgas en localidades en Nuevo León y Tamaulipas.

8.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Detección de anticuerpos contra *R. typhi* en suero de roedores por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA).
- b) Identificación de pulgas de los roedores y determinación de la presencia del DNA rickettsial por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

9.- MATERIAL Y METODO

9.1.- AREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en varias localidades de Nuevo León (fig. 20) y Tamaulipas (fig. 21).

Nuevo León se encuentra localizado en el noreste de la República Mexicana entre los paralelos 27° 48' y 23° 09' de latitud norte, los meridianos 98° 26' y 101° 13' de longitud oeste. El Trópico de Cáncer atraviesa el estado, pasa a 24 Km. al sur de Dr. Arrollo y a 3 km al norte de Mier y Noriega. Con una extensión territorial de 64,555 Km. ²

Se seleccionaron tres áreas para realizar los muestreos, las dos primeras fueron seleccionadas por haberse encontrado pacientes de la Secretaria de Salud con síntomas seronegativos a dengue pero positivos a anticuerpos de *R. typhi* por la técnica de IFA. Estas áreas fueron : Allende y Dr. Arrollo. Se seleccionó el área de Lampazos por su alta densidad de roedores. Y fue colectado en Escobedo, N. L. un *Didelphys virginianus*, considerando importante incluirlo en este estudio por ser un hospedero alternativo dentro del ciclo del tifus murino.

El Estado de Tamaulipas se encuentra en la frontera norte del país, en el Golfo de México. Colinda al norte con el Texas, Estados Unidos , al sur con Veracruz y San Luis Potosí, y al poniente con el estado de Nuevo León. Se encuentra localizado en las siguientes coordenadas: Al norte 27°40', al sur 22° 12' de latitud norte; al este 97° 08', al oeste 100° 08' de longitud oeste. Con una longitud de línea de costa de 320 Km. Predomina el clima semicalido y subhúmedo con lluvias en verano. Fue seleccionada la localidad de

Matamoros, localizada al norte del estado, por las densidades altas de roedores presentes en esa área (INEGI,2002)



Figura 20. Nuevo León

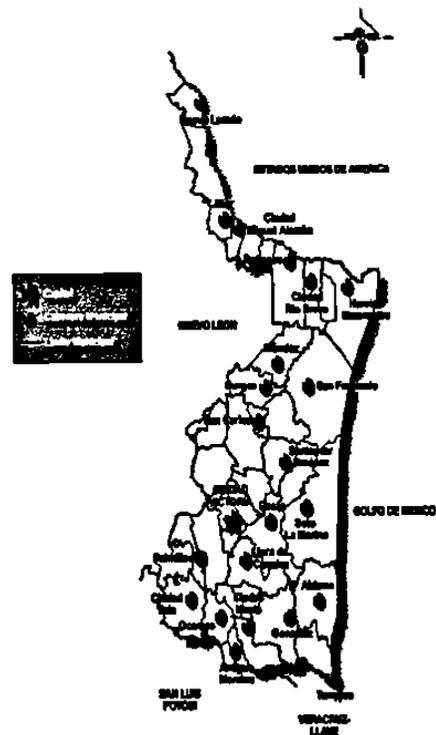


Figura 21. Tamaulipas

9.2.- METODOS DE COLECTA

9.2.1.- COLECTA DE ROEDORES Y SUS ECTOPARÁSITOS

Se utilizaron trampas Sherman. Estas se prepararon con cebo para roedores que consistió en diferentes granos de cereales (avena, trigo, maíz, etc.) impregnados con crema de cacahuete (fig.22). Se colocaron dentro de las trampas para atraer al roedor. Las trampas se distribuyeron cada 15 - 20 metros en los lugares de la localidad con alta densidad de roedores y/o cerca de los lugares donde se encontraron pacientes seropositivos a *R. typhi* reportados por la SSA. Se colocaron entre 150 – 200 trampas Sherman en cada muestreo, por área (fig. 23). El muestreo se realizó por un tiempo aproximado de 8 meses . Ya colectados los roedores se llevaron al Laboratorio de Entomología Médica para su identificación y la obtención de ectoparásitos y muestras de sangre. (Fig. 2).

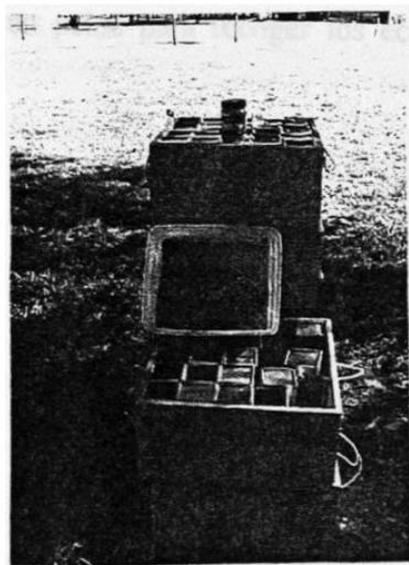


Figura 22. Trampas Sherman con cebo de diferentes granos de cereales.

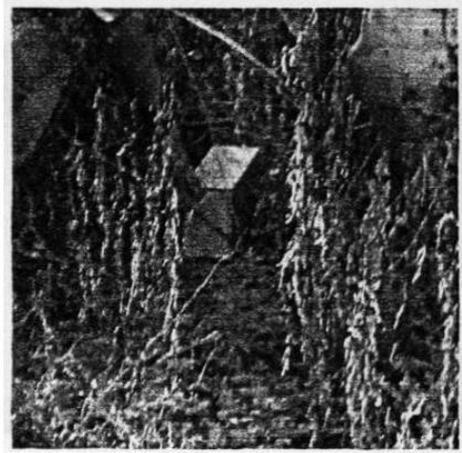


Figura 23 . Colocación de las trampas

Los roedores dentro de las trampas Sherman se introdujeron en bolsas de plástico conteniendo una torunda de algodón impregnada con cloroformo para anestesiarlos, también se introdujeron en bolsa de plástico para tratar de recuperar los ectoparásitos dentro de ella (fig.24). Se utilizaron pinzas entomológicas, un hisopo de algodón impregnado con cloroformo y/o un peine para recoger los ectoparásitos del cuerpo del roedor (fig 25).



Figura 24 . Roedores en bolsa de plástico con cloroformo.

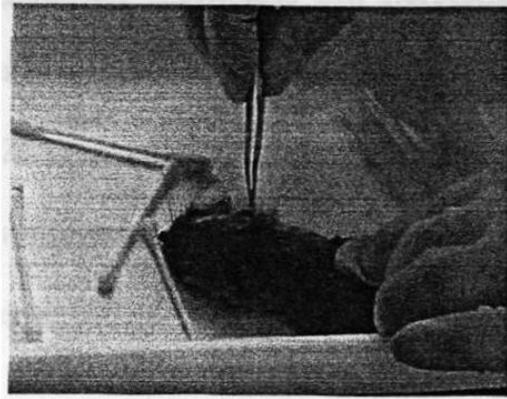


Figura 25 . Colecta de ectoparásitos

Ya colectados los ectoparásitos se transportaron al Laboratorio de Entomología y Artrópodos para su identificación. Se observaron los ectoparásitos al microscopio estereoscópico y compuesto para identificar especies de pulgas posibles vectores de *R. typhi*. Para la identificación de las especies de pulgas se utilizó bibliografía específica (CDC,1992; Kim,1986; Burrus,1979). Los ectoparásitos encontrados fueron preservados en alcohol etílico 70%; para su posterior estudio para determinar la presencia de *R. typhi* por la técnica de PCR .

9.2.2.- INDICE DE DIVERSIDAD DE SHANNON – WIENER

Se calculó el índice de Diversidad de Shannon – Wiener para cada una de las localidades, basándose en el cuadro de distribución y abundancia ($H' = \sum p_i \ln p_i$) (Pérez, 1993).

9.2.3.- OBTENCION DE MUESTRAS DE SUERO DE ROEDORES

El roedor fué ligeramente anestesiado con cloroformo, teniendo cuidado de no matarlo para obtener la mayor cantidad de sangre posible por punción cardiaca, con una jeringa de insulina (fig. 26). La sangre obtenida se colocó en tubos eppendorf de 2ml. El suero fue obtenido por centrifugación y decantación. El suero se conservó a -20° C, para su posterior estudio para detectar anticuerpos contra *R. typhi* por IFA.

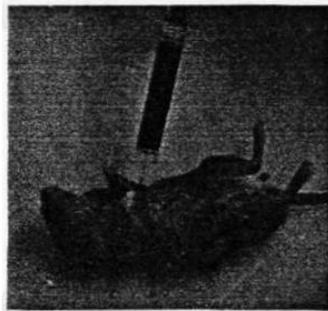


Figura 26. Obtención de sangre por punción cardiaca.

9.3.- TECNICAS PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE *R. typhi*

9.3.1.- TECNICA DE IFA

La técnica que se utilizó para determinar seroprevalencia en roedores fue la de inmunofluorescencia indirecta (IFA, según referencia del Lab. de Enfermedades Infecciosas de la UTBM, Galveston, Texas). La técnica de IFA utiliza portaobjetos con el antígeno de *R. typhi* fijado (Fig.27); es un procedimiento “sándwich” que se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa el suero del roedor y del control se diluyeron (1: 64) en placas inmunológicas (fig.28). Se colocaron 10 µl del suero diluido en el portaobjetos con el antígeno (fig. 29).

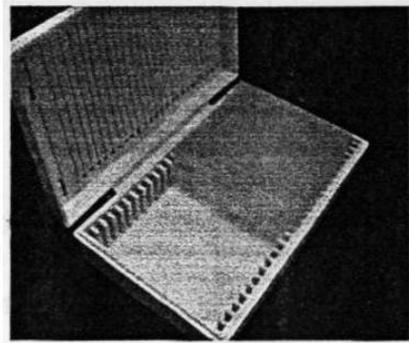


Figura 27 . Portaobjetos con el antígeno de *R. typhi*

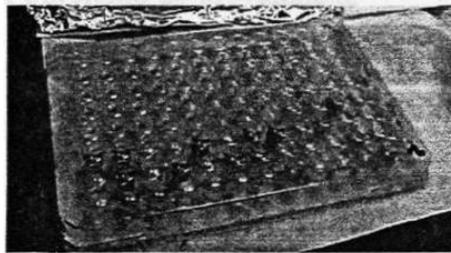


Figura 28 . Sueros de roedores diluidos

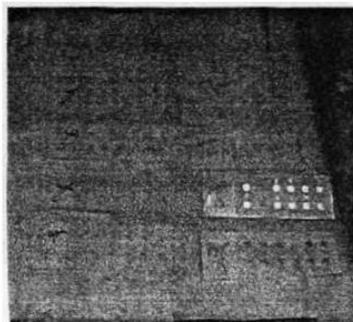


Figura 29. Colocación de los sueros en el portaobjetos con el antígeno.

Se realizó la incubación del portaobjetos (fig.30). La incubación se llevo a cabo a 37° C por 30 minutos, en este paso si un suero resulta ser positivo para anticuerpos a antígenos rickettsiales se formara el complejo antígeno- anticuerpo correspondiente. Después de la incubación el portaobjetos se lavó en una solución de PBS 0.1%.En la segunda etapa cada pozo con el complejo antígeno-anticuerpo fue cubierto con fluoresceína – anti IgG humana. Se incubó nuevamente el portaobjetos para que se llevara a cabo la reaccion de la fluoresceína con el complejo. Se realizó un lavado y se tiñó con azul Evans (fig. 31). Ya seco se montó y examinó usando microscopio de fluorescencia. La reacción fue positiva cuando se observaron cuerpos rickettsiales exhibiendo citoplasma fluorescente rojo-verde brillante contra un fondo rojo oscuro. Se registraron las muestras positivas y se determinó el porciento de prevalencia.

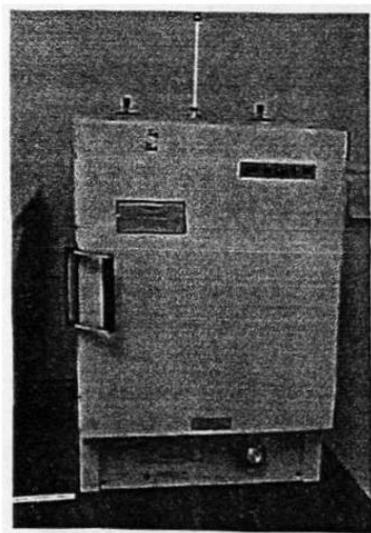


Figura 30. Incubación.



Figura 31 . Tinción con azul de Evans

9.3.2.- TECNICA DE PCR PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE DNA RICKETTSIAL EN PULGAS

Para realizar la técnica de PCR, primero se realizó una extracción de DNA de *R. typhi* de 16 pulgas colectadas de diferentes roedores. Esto se llevó a cabo lavando las pulgas con PBS (fig.32). Se trituraron con un pistilo estéril hasta que no se observó ninguna parte entera de la pulga. Se obtuvo un homogenato (fig. 33).

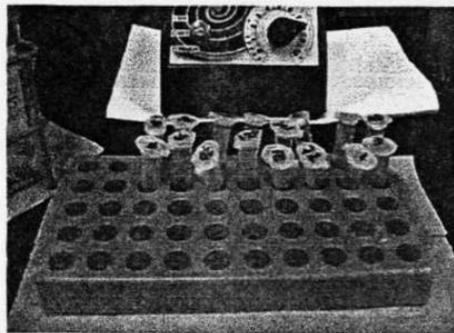


Figura 32 . Pulgas en PBS.



Figura 33. Homogenato

Se agregó SDS 1% y proteinasa K 1% y se incubó por 1 hora a 37. La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando una solución fenol-cloroformo (24:1), se centrifugó 14,000 rpm/ 3 minutos por 4 veces Y se hizo otro pase por cloroformo 1/10. Se decantó y se agregó alcohol etílico 100% para precipitar. Se mezcló y se reposó a -80° C por una hora. Se centrifugó para obtener el pelet de DNA a 14,000 rpm/10min. Se secó a vacío a 45°C. (fig. 34 y 35).



Figura 34. Centrifugación



Figura 35 . secado al vacio

Para realizar la técnica de PCR se diluyó el pelet de DNA con 100 μ l de agua DI y se determinó la concentración y pureza de DNA, utilizando 1 μ l de la muestra (fig. 36).

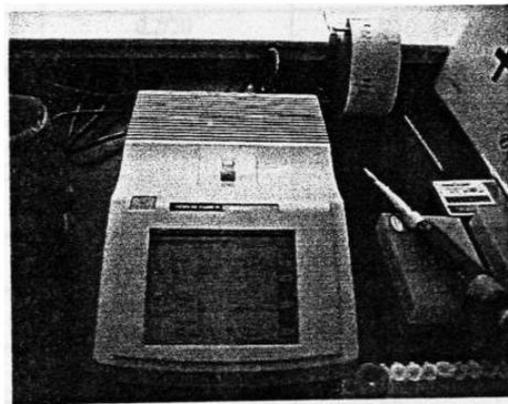


Figura 36 . Determinación de la concentración de DNA.

Se utilizaron diferentes volúmenes de la muestra de DNA, 25 μ l de Master mix, 1 μ l de cada uno de los primers 1 y 2 y un volumen necesario de agua estéril para completar 50 μ l en total (tabla 1). Se realizó la amplificación de DNA de la siguiente manera :7'95°C y 30" 94°C, 1' 57°C, 2' 70°C, x 30 y 2' 72°C (fig. 37).

Tabla 1. Volúmenes de los componentes de PCR utilizados en DNA rickettsial extraído de pulgas de roedores colectados durante noviembre del 2002 a junio del 2003.

Tubo	Muestra	Concentración/vol. μ g/ μ l	Primer1/2 μ l/ μ l	H ₂ O esteril,DL. μ l	Master mix μ l
1	Control positivo	0.21	1/1	22	25
2	Control negativo	23	1/1	-	25
3	70	0.2/1	1/1	22	25
4	59	0.2/20	1/1	3	25
5	72	0.2/23	1/1	-	25
6	21	0.2/2.8	1/1	20.2	25
7	3	0.2/5	1/1	18	25
8	91	0.2/10	1/1	13	25
9	1	0.2/20	1/1	3	25
10	90	0.2/23	1/1	-	25
11	120	0.2/2.5	1/1	20.5	25
12	18	0.2/23	1/1	-	25
13	2	0.2/20	1/1	3	25
14	108	0.2/23	1/1	-	25
15	66	0.2/23	1/1	-	25
16	11	0.2/23	1/1	-	25
17	109	0.2/23	1/1	-	25
18	60	0.2/10	1/1	13	25



Figura 37. Amplificación del DNA rickettsial.

El producto de PCR se diluyó en bufer y se colocó de la siguiente manera en cada pozo en gel de agarosa al 1%: marcador de DNA, control positivo, control negativo, muestras del producto de PCR. Se realizó la electroforesis a 75 volts/ 30 minutos (fig. 38). Se sumergió el gel en una solución de cloruro de etidio por 3 minutos. Se comprobó la presencia de fragmentos de DNA de *R. typhi* en los geles de agarosa mediante un transiluminador de UV (fig. 39 y 40).

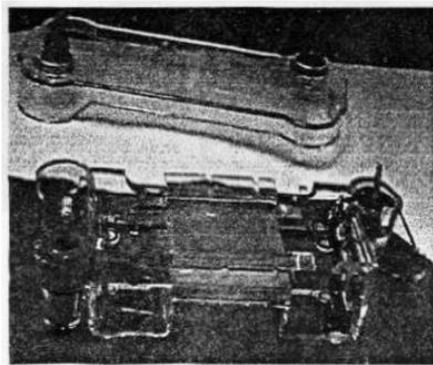


Figura 38 . Electroforesis

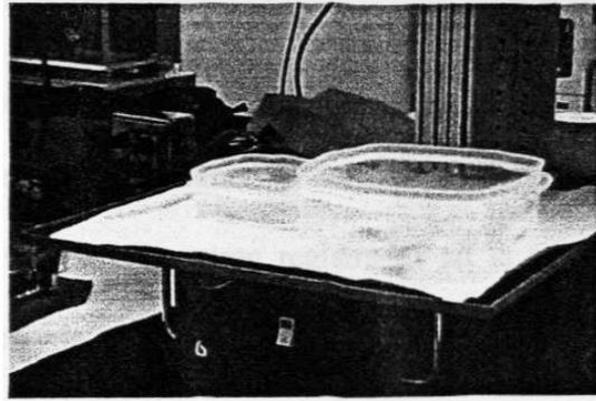


Figura 39. Gel en cloruro de etidio

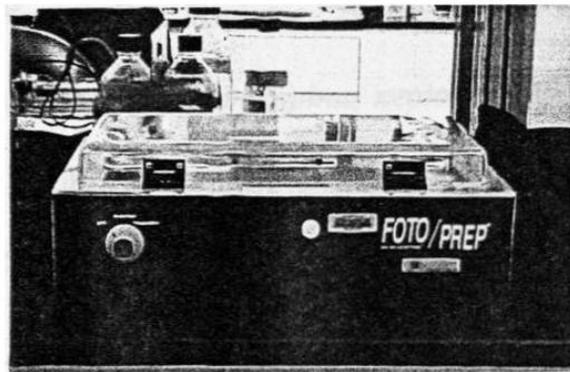


Figura 40. Transiluminador UV