

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE  
RICKETTSIA SP. Y SUS POSIBLES ARTROPODOS  
VECTORES EN EL ESTADO DE NUEVO LEON  
Y VERACRUZ, MEXICO

**POR:**

**AARON MEDINA SANCHEZ**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** con especialidad en  
entomología médica

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS**

ENERO 2013

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SUBDIRECCION DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *RICKETTSIA SP.* Y  
SUS POSIBLES ARTRÓPODOS VECTORES EN EL ESTADO DE  
NUEVO LEÓN Y VERACRUZ, MÉXICO**

**Por**

**AARÓN MEDINA SÁNCHEZ**

**Como requisito parcial, para optar el grado de DOCTOR EN  
CIENCIAS con especialidad en entomología medica**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS**

**Enero, 2013**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *RICKETTSIA SP.* Y  
SUS POSIBLES ARTRÓPODOS VECTORES EN EL ESTADO DE  
NUEVO LEÓN Y VERACRUZ, MÉXICO**

**Comité de Tesis**



---

**Dr. Ildéfonso Fernández Salas**  
**Director de tesis**



---

**Dr. David H. Walker**  
**Director Externo**



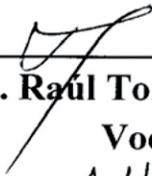
---

**Dr. Eduardo Rebollar Tellez**  
**Secretario**



---

**Dr. Roberto Mercado Hernandez**  
**Vocal**



---

**Dr. Raúl Torres Zapata**  
**Vocal**



---

**Dr. Feliciano Segovia Salinas**  
**Vocal**

*DEDICADA*

*A MIS PADRES:*

*Sergio Medina Castillo y Irene Sanchez Vargas  
Por todas las enseñanzas que a lo largo de mi vida me han ido  
transmitiendo, además de su apoyo total e incondicional. Ellos son  
mi principal motivación y espero poder regresarles algo de lo  
mucho que me han dado. Este grado es por ustedes.*

*A MI HERMANA:*

*Arely Medina Sanchez  
A quien quiero mucho y siempre tendrá mi apoyo.*

*A MI FAMILIA:*

*Especialmente  
Guillermo Niño Medina  
Ángel Niño Medina  
Va por ustedes también, con todo cariño!*

*A MI NOVIA:*

*Carolina Hernández Ochoa  
Te dedico mi grado por estar a mi lado,  
Por el cariño que me demuestras,  
Y por hacerme sentir amado.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ildefonso Fernández Salas, asesor de esta tesis, quien además de darme la oportunidad de pertenecer en su equipo de trabajo dentro del laboratorio de entomología medica, confió en mí para poder realizar mi estancia en UTMB y por tener la paciencia para formarme como un Doctor en Ciencias.

Al Dr. David Walker que gracias a su guía y experiencia en el campo de la ciencia fue posible que este doctorado se hiciera realidad. Gracias por compartir su conocimiento y por permitirme formar parte de su equipo de investigadores.

Al Dr. Bouyer por ser mi entrenador y enseñarme mucha de las herramientas y técnicas para poder realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Popov, y Dr. Ted Whitworth por asesorarme en todo lo relacionado con la microscopia electrónica.

Al Dr. Darwin Elizondo por su amistad y por brindarme su apoyo como compañero de trabajo.

A los M.C. Gabriel Ruiz y Mario Guerrero, dos de los mejores amigos, que logre encontrar durante mi estancia y formación dentro del postgrado de la FCB-UANL y a los cuales agradezco mucho la amistad y animo que siempre han logrado trasmitirme.

Al Dr. José Ignacio González, por su amistad, apoyo, y por que sabiamente logro transmitirme el ánimo para sacar adelante mi postgrado.

A los compañeros y Amigos del Laboratorio de Entomología Medica y de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL; Especialmente a la QBP Rossy quien siempre me brindo su apoyo para coordinar este proyecto, al Dr. Aldo, Dr. Gustavo, Dra, Adriana, por sus consejos y enseñanzas.

A todos los compañeros de UTMB; Dr. Nahed, Dr. Heather, Dr. Yu, Patricia, Dr. Rita, Kuyler, Mike, Dr. Adriano, Dr. Mafra.

Al Dr. Zavala del Centro de investigaciones Hideyo Nogushi, quien me compartió parte de su conocimiento para aplicarlo en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para llevar a buen término mis estudios de Doctorado. Becario No. 176974

Al Fogarty International Center of the National Institutes of Health (D43 TW00903), por el financiamiento de mi entrenamiento y formación como investigador en UTMB.

# CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>4</b>
<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>4</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
<b>Rickettsiología</b> .....	<b>5</b>
<b>Bacteria</b> .....	<b>6</b>
<b>Rickettsiae y artrópodos</b> .....	<b>8</b>
<b>Rickettsiosis en la historia</b> .....	<b>12</b>
<b>Rickettsiólogos en México</b> .....	<b>15</b>
<b>Casos confirmados en México por técnicas de biología molecular</b> .....	<b>17</b>
<b>Diagnóstico de las enfermedades Rickettsiales</b> .....	<b>18</b>
<b>Presentación Clínica y Observaciones</b> .....	<b>18</b>
<b>Diagnostico por serología</b> .....	<b>19</b>
<b>Aislamiento de Rickettsiae</b> .....	<b>21</b>
<b>Cultivo celular</b> .....	<b>21</b>
<b>Identificación de Rickettsiae</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPITULO 1. Búsqueda de seroprevalencia e identificación del agente etiológico de rickettsiosis y sus artrópodos vectores en el Sur de Nuevo Leon, México</b> .....	<b>25</b>
<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>Área De Estudio</b> .....	<b>26</b>
<b>Estudio Serológico</b> .....	<b>26</b>
<b>Immunofluorescencia Indirecta (IFI)</b> .....	<b>26</b>
<b>Colecta de garrapatas</b> .....	<b>28</b>

<b>Identificación de Garrapatas.....</b>	<b>28</b>
<b>Aislamiento de Rickettsia.....</b>	<b>28</b>
<b>Western blot.....</b>	<b>29</b>
Preparación de antígeno en membrana de nylon. ....	29
Western Immunoblot .....	29
<b>Extracción de ADN de garrapatas.....</b>	<b>29</b>
<b>Aislamiento de rickettsia en garrapatas.....</b>	<b>30</b>
<b>Técnica de PCR para determinar la presencia de DNA rickettsial en garrapatas...30</b>	<b>30</b>
<b>Microscopia Electrónica de Transmisión .....</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>Resultado de la identificación de rickettsiae por PCR en garrapatas colectadas del municipio de linares en Junio 2004 (Primera Colecta) .....</b>	<b>37</b>
<b>Resultados de intentos de Aislamiento en cultivo celular. ....</b>	<b>38</b>
<b>Caracterización Genética.....</b>	<b>38</b>
<b>Repetición de Resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>Resultado de análisis por Microscopia Electronica de Transmision (MET) .....</b>	<b>43</b>
<b>Resultados Segunda Colecta en el municipio de Linares, N.L.....</b>	<b>45</b>
<b>Resultados de Pruebas de hemolinfa.....</b>	<b>45</b>
<b>Aislamiento de <i>Rickettsia rickettsii</i> en <i>Amblyomma imitator</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>Transmisión transovarial de <i>Amblyomma imitator</i> con énfasis en <i>Rickettsia prowazekii</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>Resultados de pruebas de trasmisión transovarial.....</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>51</b>
<b>Aislamiento de <i>R. prowazekii</i> en <i>Amblyomma imitator</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>Identificación de <i>R. belli</i> en <i>Dermacentor variabilis</i> obtenida en el sur del estado de Nuevo León .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPITULO 2.    Búsqueda de seroprevalencia e identificación del agente etiológico de rickettsiosis y sus artrópodos vectores en un poblado rural del estado de Veracruz, México. ....</b>	<b>54</b>
<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>55</b>
<b>Area de estudio .....</b>	<b>55</b>
<b>Colección de Artrópodos.....</b>	<b>56</b>
Piojos.....	56
Garrapatas.....	57
<b>Metodología de Aislamiento e identificación de Rickettsiae.....</b>	<b>58</b>
Prueba de hemolinfa.....	58
Aislamiento en viales <i>Shell</i> .....	59
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>Resultados de búsqueda de posibles artrópodos vectores de rickettsiosis. ....</b>	<b>61</b>

<b>Resultados de Prueba de Hemolinfa .....</b>	<b>63</b>
<b>Resultados de aislamientos en cultivo celular .....</b>	<b>63</b>
<b>Resultados de Análisis de PCR y Secuenciación Genética.....</b>	<b>65</b>
<b>Resultados del análisis por microscopia electrónica de transmisión (MET).....</b>	<b>66</b>
<b>Resultado de estudio de seroprevalencia de ag Rickettsiae.....</b>	<b>69</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA .....</b>	<b>74</b>
<b>APENDICES.....</b>	<b>83</b>
<b>    Apéndice A.-    Resultados de inmunofluorescencias, del estudio realizado en los     municipios de Allende y Linares, Nuevo León, México. ....</b>	<b>83</b>
<b>RESUMEN BIOGRAFICO .....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología típica de una rickettsia. ....	7
<b>Figura 2.</b> Filogenia de las Rickettsiae. ....	11
<b>Figura 3.</b> Distribución de rickettsiosis en México en los años cuarenta. ....	17
<b>Figura 4.</b> Distribución de estudios recientes en el país. ....	18
<b>Figura 5.</b> Caso pediátrico de fiebre mancha en Hermosillo, Sonora, México. ....	19
<b>Figura 6.</b> Ilustración de inmunofluorescencia indirecta (IFI). ....	27
<b>Figura 7.</b> Revelado de western blot. ....	33
<b>Figura 8.</b> Dragado en vegetación para colección de garrapatas en el municipio de Allende, NL. ....	34
<b>Figura 9.</b> Zona característica para colección de garrapatas en el municipio de Linares. ....	35
<b>Figura 10.</b> Área genital de <i>Amblyomma imitator</i> ....	35
<b>Figura 11.</b> <i>Amblyomma imitator</i> , colectada en el municipio de Linares Nuevo León. ....	36
<b>Figura 12.</b> Diagrama de agrupamiento de garrapatas colectadas en el municipio de Linares, N.L. para su análisis por PCR y su posterior aislamiento. ....	37
<b>Figura 13.</b> Fotografía de gel de agarosa, mostrando uno de los resultados de PCR anidado usando los primers 17kDa . ....	37
<b>Figura 14.</b> Fotografía de gel de agarosa, mostrando el resultado de un PCR de <i>ompB</i> de DNA de la rickettsia aislada en el municipio de Linares, Nuevo León. ....	39
<b>Figura 15.</b> Fotografía de gel de agarosa de PCR 17kDa confirmatorio. ....	39
<b>Figura 16.</b> Fotografía de gel de agarosa negativo <i>ompA</i> . Donde F5 es uno de los aislados obtenidos a partir de garrapatas del municipio de Linares. ....	40

<b>Figura 17.</b> Porcentaje de identidad y porcentaje de divergencia, al analizar las secuencias del gen <i>ompB</i> .....	40
<b>Figura 18.</b> Árbol filogenético de <i>R. prowazekii</i> aislado en Linares, del gen <i>ompB</i> .....	41
<b>Figura 19.</b> Árbol filogenético de <i>R. prowazekii</i> aislado en Linares, del gen 17kDa.....	41
<b>Figura 20.</b> Árbol filogenético de <i>R. prowazekii</i> aislado en Linares, del gen Citrato sintetasa o <i>gltA</i> .....	42
<b>Figura 21.</b> Microfotografía MET de una rickettsiae... ..	43
<b>Figura 22.</b> Microfotografía MET de un cumulo de rickettsias de aproximadamente 1µ (micrón), infectando células del intestino de una garrapata <i>Amblyomma imitator</i> .....	44
<b>Figura 23.</b> Gel de Agarosa , amplificando un fragmento del gen citrato sintetasa, .....	47
<b>Figura 24.</b> Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, evidenciando la amplificación de un fragmento del gen citrato sintetasa de dos muestras considerándose positivas a la presencia de material genético rickettsial. ....	48
<b>Figura 25.</b> Gel de agarosa resultados de dos pools de huevecillos positivos (33-38).....	48
<b>Figura 26.</b> Diseño experimental de pruebas de transmisión transovarial y capacidad de <i>A. imitator</i> de transmitir rickettsia .....	50
<b>Figura 27.</b> <i>R. prowazekii</i> libres en el citoplasma de fibroplastos de embriones de pollo infectados .....	52
<b>Figura 28.</b> Ubicación de Reyixtla, Veracruz,.....	55
<b>Figura 29.</b> . Características de las edificaciones de Reyixtla, Veracruz .....	56
<b>Figura 30.</b> Búsqueda de artrópodos vectores en pliegues de costuras de las vestimentas de los pobladores de Reyixtla, en el estado de Veracruz, México.....	57
<b>Figura 31.</b> Recolección de información mediante un cuestionario y toma de muestras de sangre en los pobladores de Reyixtla, Veracruz, Mex.....	57

<b>Figura 32.</b> Dragado de vegetación utilizando una lona color blanca para la fácil detección de garrapatas .....	58
<b>Figura 33.</b> Herida causada por mordedura de garrapata en espalda de habitante de la comunidad de Reyixtla.....	62
<b>Figura 34.</b> Garrapata <i>Amblyomma cajennense</i> especie colectada en la periferia de Reyixtla, y la cual se encontró en mayor proporción.....	62
<b>Figura 35.</b> <i>Amblyomma ovale</i> , colectada en Reyixtla, Veracruz, México .....	63
<b>Figura 36.</b> Tinción Diff-Quik de rickettsias diseminadas en todo el citosol.. .....	64
<b>Figura 37.</b> Fotografía de MET de una <i>Rickettsia amblyommii sp nov</i> .....	66
<b>Figura 38.</b> Fotografía MET donde se observan cúmulos de rickettsias dentro del citosol de células Vero.....	67
<b>Figura 39.</b> Fotografía MET de bacterias <i>Rickettsia</i> y <i>Wolbachia</i> dentro de células epiteliales del intestino de una garrapata del genero <i>A. cajennense</i> .. .....	68
<b>Figura 40.</b> Fotografía MET donde se observa un halo electro translucido, y un endosimbionte bacteriano de garrapata presuntamente <i>Wolbachia sp</i> .....	69
<b>Figura 41.</b> Imagen de un suero positivo a inmunofluorescencia, usando antígeno de <i>Rickettsia amblyommii</i> . .....	70
<b>Figura 42.</b> Western blot, para demostrar la reacción cruzada con <i>R. rickettsii</i> .....	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Asociación de género de garrapata con especie de rickettsiae.....	10
<b>Tabla 2.</b> Manifestaciones clínicas de tifo epidémico y tifo murino .....	24
<b>Tabla 3.</b> Listado de primers usados para la identificación y caracterización genética de <i>Rickettsia</i> .....	32
<b>Tabla 4.</b> Especies de garrapatas obtenidas de animales domésticos del municipio de Linares, NL. ....	46
<b>Tabla 5.</b> Resultados del análisis de los genes <i>17kDa</i> , <i>gltA</i> y <i>ompA</i> .....	65

## RESUMEN

Las rickettsias son bacterias Gram negativas, parásitos obligados intracelulares, y es causa de muchas enfermedades zoonóticas en todos los continentes. Además existe una relación artrópodo-bacteria, que es también frecuentemente capaz de infectar vertebrados, incluyendo humanos, usualmente como hospedero accidental.

El Objetivo de este trabajo es el de identificar las rickettsias presentes en las zonas endémicas de rickettsiosis en el Sur del estado de Nuevo León y Zona norte del estado de Veracruz así como sus posibles artrópodos vectores. Metodología; Para la identificación de anticuerpos específicos a rickettsias se realizaron inmunofluorescencias indirectas, en sueros de pacientes sospechosos de dengue y de Chagas en el caso de Veracruz. La colecta de garrapatas en esta zona se realizó mediante dragado y directo de hospederos. Para el diagnóstico de las garrapatas se realizó un PCR anidado, usando *primers* específicos para el género rickettsial, y la técnica de shell vial fue utilizada para el aislamiento. Los resultados de las inmunofluorescencias dieron evidencia de presencia de anticuerpos anti-rickettsias del grupo tifo y fiebre manchada, además western blots mostraron bandas con mayor afinidad al grupo tifo en el caso del estudio de N.L. y en Veracruz se identificó una rickettsia del grupo de las fiebres manchadas. Los resultados de los análisis preliminares por PCR anidado de los especímenes vivos mostraron resultados positivos al gen de la proteína 17kDa específico para rickettsias. El intento de aislamiento de los especímenes positivos al PCR anidado, mediante la técnica de shell vial fue exitoso por lo tanto se realizó un análisis de microscopía electrónica y se empezó a realizar una caracterización genética usando los genes de *ompB*, *ompA* y *gltA* de esta rickettsia. Los resultados obtenidos del análisis de los especímenes muestreados mostraron estructuras morfológicas específicas al grupo de rickettsial tifo. Las secuencias del gen *ompA* mostraron resultados negativos, y los genes 17kDa y *gltA*. *ompB* dieron >99% de similitud a *R. prowazekii* en el estado de Nuevo León y en el Estado de Veracruz se identificó a *R. amblyommii* como la principal rickettsia presente en el poblado estudiado. Además inmunofluorescencia y western blot fueron realizados usando las rickettsias aisladas como antígeno para confirmar los resultados obtenidos. Conclusiones: El aislamiento de *Rickettsia prowazekii* de una garrapata del género *Amblyomma imitator* del municipio de Linares, y rompe con el paradigma de ser una Rickettsia que solo se encuentra en piojos. Por primera vez en México se logró identificar y aislar a *R. amblyommi* de su reservorio natural y posible vector la garrapata *Amblyomma cajennense*. A pesar que no se considera una rickettsia con alta virulencia existe la posibilidad que las manifestaciones clínicas por esta infección no son monitoreadas y registradas a detalle y fácilmente puede ser enmascarada por otras enfermedades. Por lo que los pobladores, médicos y autoridades de estas zonas deben de estar informados de los riesgos que conlleva la picadura de la garrapata.

## ABSTRACT

Rickettsiae are Gram negative, intracellular obligate parasites, and cause many zoonotic diseases across continents. There is also a relationship arthropod-bacterium, which is frequently also capable of infecting vertebrates, including humans, usually as accidental host. The objectives of this work are identifying rickettsiae and the potential arthropod vectors present in endemic areas of rickettsiosis in southern Nuevo Leon and northern state of Veracruz. Methodology; for detection of specific antibody indirect immunofluorescence assays were performed in sera from patients suspected of dengue and Chagas in the case of Veracruz. The collection of ticks in this area was performed by direct drags from the ground and straight from the hosts. To detect rickettsia in ticks a nested PCR was performed using primers specific for the genus Rickettsiae, and shell vial technique was used for isolation. Immunofluorescence results gave evidence of the presence of antibodies to typhus and spotted fever group rickettsiae; western blots also showed bands with higher affinity to the typhus group in the case of the study of NL and in Veracruz identified antibodies to spotted fever group rickettsia. The results of the preliminary analysis by nested PCR on living ticks showed positive results *17kDa* protein gene specific for rickettsiae. The attempted isolation of positive specimens by nested PCR with shell vial technique was successful. Electron microscopy analysis and genetic characterization using *ompB*, *ompA* and the rickettsia *gltA* genes were performed. The results obtained from the analysis of sampled specimens showed specific morphological structure of typhus group rickettsiae. PCR for *ompA* gene sequences was negative for the organism; *17kDa*, *gltA*, and *ompB* gene gave > 99% similarity to *R. prowazekii* in the state of Nuevo Leon; in the state of Veracruz the agent was identified as *R. amblyommii* in the village studied. Furthermore immunofluorescence and western blot were performed using the isolated rickettsiae as antigen to confirm the results. Conclusions: Isolation of *Rickettsia prowazekii* from an *Amblyomma imitator* tick of the municipality of Linares breaks the paradigm of being a *Rickettsia* found only in lice. For the first time in Mexico *R. amblyommi* was identified as well as the natural host the tick *Amblyomma cajennense*. Although *R. amblyommii* is not considered a highly virulent rickettsia there still exists the possibility that the clinical manifestations of this infection are not monitored and recorded in detail and can easily be masked by other conditions. So the population, villager's doctors and authorities of these areas should be informed of the risks associated with tick bite.

# INTRODUCCIÓN

Las rickettsias son un grupo heterogéneo de pequeñas bacterias Gram negativas, cocobacilares y bacilos cortos, además que son parásitos obligados intracelulares por lo tanto requieren de una célula viva para poder reproducirse. Estas bacterias tienen una relación artrópodo-bacteria que con frecuencia infectan vertebrados, por lo tanto causan muchas enfermedades zoonóticas en todos los continentes incluyendo a los humanos usualmente como hospederos accidentales.

La presencia de las enfermedades causadas por rickettsias o rickettsiosis está directamente relacionada por la presencia de sus artrópodos vectores que principalmente son: las pulgas, piojos, ácaros y garrapatas.

En México existen reportes históricos de las décadas de los 1930 y 1950 de la ocurrencia de tifo epidémico o exantemático, tifo murino o endémico y de fiebre manchada de las montañas rocosas, sin embargo estos estudios se han realizado con técnicas antiguas como la fijación por complemento que se demostró en otros estudios que puede existir in-especificidades o reacciones cruzadas entre rickettsias del mismo grupo y que por lo tanto es muy difícil lograr realizar una identificación certera.

En la actualidad existen herramientas genéticas, que gracias al desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y con el uso de técnicas moleculares modernas es posible amplificar, secuenciar y comparar el material genético aislado con un banco de genes disponible desde cualquier parte del mundo y con esto saber exactamente cuál es la cepa aislada.

En México pocos estudios modernos se han realizado para identificar el agente etiológico de una rickettsiosis, la gran mayoría de los estudios realizados usando técnicas moleculares han sido solo realizadas en el estado de Yucatán.

A pesar que han existido programas de erradicación de tifo en el país y que se han logrado identificar las zonas mayor endemidad (México, Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Nuevo León, Hidalgo, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz), pocos estudios modernos se han realizado para dilucidar cuál es el agente etiológico y cuál es su artrópodo vector.

Para dilucidar que rickettsias son las responsables de provocar la seroprevalencia rickettsial en los estados de Nuevo León y Veracruz, uno de los objetivos de este trabajo fue el de aislar la rickettsia mediante el uso de técnicas de cultivo celular, identificarlo genéticamente por técnicas moleculares, realizar una identificación ultra-estructural de esta rickettsia en el vector. Otro de los objetivos es el de identificar cuales son los posibles artrópodos vectores en estas regiones endémicas.

Los resultados de este estudio mostraron que efectivamente las zonas en estudio son de riesgos de ser infectados por rickettsiosis debido a la presencia de uno de los vectores

principales de rickettsiosis que son las garrapatas, además que gracias a este estudio se logro identificar por primera vez que la especie *Amblyomma imitator* estaba presente en el estado de Nuevo León y que es vector de *R. rickettsii*, también se logro identificar por primera vez la presencia de *R. prowazekii* en garrapatas, algo inusual debido a que el vector es comúnmente los piojos *Pediculus humanus*.

En el noroeste del estado de Veracruz basado en estudios previos de seroprevalencia de rickettsiosis nos planteamos una serie de objetivos con el fin de dilucidar la situación de la presencia de estos anticuerpos en esta zona. Uno de los objetivos era el de identificar el posible vector de esta infección y el segundo objetivo era el de aislar el agente etiológico.

Con la colaboración de la secretaria de salud del estado de Veracruz, logramos identificar al posible artrópodo vector, además de que se demostró que la gran mayoría de sus habitantes habían sido expuestos a mordeduras de garrapatas de forma continua. El aislamiento del agente etiológico y su identificación genética, arrojaron resultados únicos en la historia de la rickettsiosis en el país.

## **HIPOTESIS**

Los Estado Nuevo León y Veracruz son zonas previamente identificada como endémica de tifo, por lo tanto el agente etiológico presente en esta zona es *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*, y sus artrópodos vectores son los piojos y pulgas, Sin embargo la zona en estudio por ser ganadera, es muy posible que existan diferentes especies de garrapatas, las cuales son vectores de una gran variedad de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Identificar y caracterizar las rickettsias presentes en el sur del estado de Nuevo León y noroeste de Veracruz así como a sus respectivos artrópodos vectores.

### Objetivos Específicos

1. Aislar la o las rickettsias presentes en el sur del estado de Nuevo León, mediante el uso de técnicas de cultivo celular.
2. Identificar genéticamente la cepa aislada, mediante la secuenciación de los genes; *ompA*, *ompB*, *gltA*, y *17 kDa*
3. Realizar una identificación ultra-estructural mediante el uso de la microscopia electrónica de transmisión.
4. Identificar el género y especie de los posibles artrópodos vectores en las zonas de estudio.

## ANTECEDENTES

### Rickettsiología

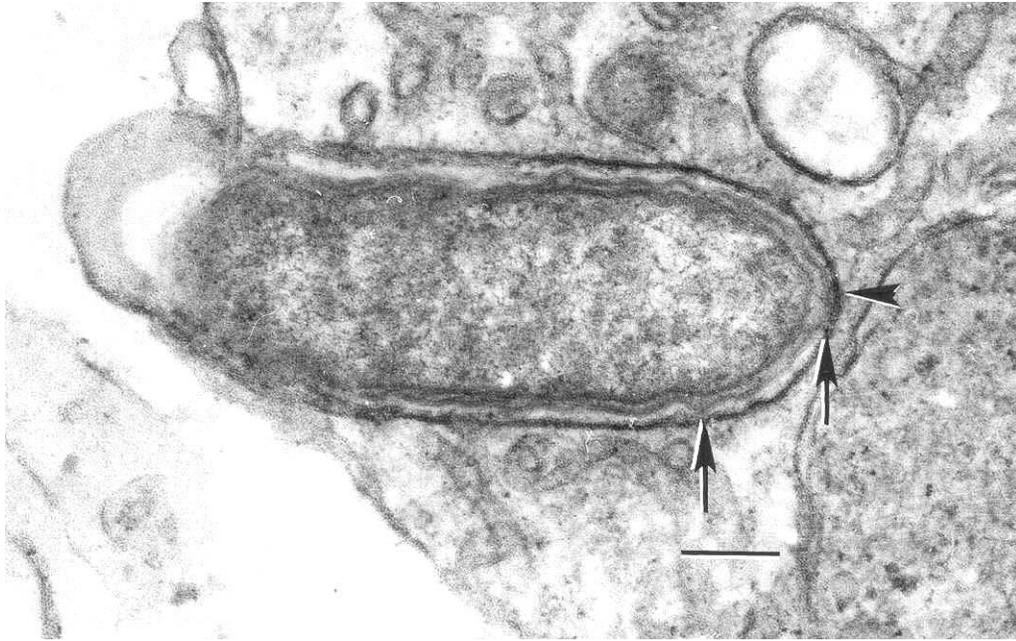
Por muchos años los rickettsiólogos han tenido la reputación de ser científicos que viven en un ambiente potencialmente peligroso. De los tres más prominentes científicos que estudiaban el tifo epidémico a principios de este siglo, el Dr. Howard Ricketts y Von Prowazek murieron de una infección rickettsial y solamente Charles Nicolle sobrevivió para recibir el premio Nobel por haber descubierto que el tifo epidémico era transmitido por las heces del piojo de cuerpo (*Pediculus humanus corporis*). (D Raoult & Roux 1997) La otra reputación de los rickettsiólogos es la estar envuelto en nuevos descubrimientos de enfermedades infecciosas ya que han adquirido nuevas técnicas para crecer parásitos intracelulares estrictos. Los rickettsiólogos han jugado un papel importante en el descubrimiento del mal del Legionario (McDade et al. 1977), enfermedad de Lyme, (Burgdorfer et al. 1982) ehrlichiosis (Maeda et al. 1987), ehrlichiosis granulocítica (Dumler et al. 1991), enfermedad de arañazo de gato (R. Regnery et al. 1992), y otras nuevas rickettsiosis en sí.

En el caso de las rickettsias comparado con otras bacterias es difícil de predecir cuales son patógenos potenciales para el humano. De hecho diferentes aislados de la misma especie varían su virulencia en el mismo hospedero. (McDade 1990) Por muchos años el único método para aislar rickettsiae era inocular animales, sobre todo conejillos de indias. Esta práctica seleccionaba solamente las cepas que eran patógenas para el hospedero experimental. Hasta después se empezaron a utilizar métodos alternativos para aislamiento como el uso de embriones de gallina o cultivo celular que permitió la caracterización de nuevos aislados. El uso de modelos animales para determinar la patogenicidad de una rickettsia puede llevar a resultados poco veraces si se quiere extrapolar a humanos. (D Raoult & Roux 1997) Por ejemplo, *Rickettsia rickettsii* cepa T-type, resulta ser altamente patógena para el humano, sin embargo al conejillo de indias solamente le causa una enfermedad leve. (F. M. Bozeman et al. 1967) Además tomando en cuenta que las rickettsias transmitidas por artrópodos, son inoculadas a la dermis, entrando a los vasos linfáticos, pasa a los nodos linfáticos y después a torrente sanguíneo uno puede suponer que todas pueden causar una enfermedad si suficiente inóculo es inyectado. La patogenicidad quizás, esté ligada a la habilidad del artrópodo de morder al humano por ejemplo; una nueva rickettsia ha sido encontrada en un escarabajo (*Hippodamia parenthesis*) y en pulgón de la alfalfa *Acyrtosiphon pisum* (Harris) y no se ha implicado en enfermedades de humanos, (Chen et al. 1996) probablemente porque los hospederos no muerden al humano. Quizás cuando una rickettsia es encontrada en un artrópodo capaz de morder al humano, debe ser considerada como un patógeno potencial de humano. (D Raoult & Roux 1997) Sin embargo también algunos patógenos no sobreviven o crecen en humanos debido a la respuesta inmunidad innata.

Actualmente las enfermedades rickettsiales transmitidas por artrópodos representan el más completo paradigma sobre la comprensión de enfermedades emergentes; de las 14 rickettsiosis reconocidas 6 han sido descritos entre los últimos 12 años. Estos síndromes descritos recientemente son resultados circunstanciales que van desde la curiosidad de un médico y de la introducción de nuevas herramientas de diagnósticos hasta el avance y mejoramiento del conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, dando como resultado la demostración de los roles patogénicos en humanos de rickettsias previamente encontradas solamente en artrópodos. (D Raoult & Roux 1997)

## **Bacteria**

Las bacterias del orden de las Rickettsiales fueron por primera vez descritas por Ricketts entre los años 1906 y 1910 y Wolback entre 1916 y 1922 y son microorganismos gram negativos bacilares pequeños que retienen la fucsia cuando se tiñe por el método de Giménez (Gimenez 1964) y crece asociada con células eucarióticas. Históricamente, la designación “rickettsia” se ha usado de manera indiscriminada para bacilos pequeños que no pueden ser cultivados y que no se pudieron identificar. El orden de los rickettsiales esta dividido en tres familias, Nombradas como *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* y *Anaplasmataceae*. La familia *Rickettsiaceae* incluía tres tribus: *Rickettsiae*, *Rochalimaea*, y *Coxiella*. En la última edición del Manual Bergey’s de Bacteriología Sistemática las tribus fueron eliminadas. El género *Rickettsia* sigue siendo parte de la familia de las *Rickettsiaceae*. *Rochalimaea* se incluyo con las *Bartonella* y se removió de la familia *Rickettsiaceae*. *Coxiella* se removió de la familia *Rickettsiaceae* y colocado en el orden “Legionellales”. Los organismos de la tribu de Ehrlichiae y Wolbachiae se combinaron en la familia de las *Anaplasmataceae*. *Rickettsia tsutsugamushi* fue colocado en el nuevo género *Orientia* ahora se llama *Orientia tsutsugamushi*. Por lo tanto ella familia *Rickettsiaceae* consiste en dos géneros: *Rickettsia* y *Orientia*. Todos los organismos en la familia están filogenéticamente relacionados. (Yu, X.J., Walker 2005)



**Figura 1. Morfología típica de una rickettsia.** Morfología bacilar típica de una *Rickettsia prowazekii* viable, infectando células Vero. La punta de flecha indica la estructura de capa microcapsular en contacto con la membrana vacuolar. Barra 0.25µm. Foto del Dr. Ted Whitworth

Las rickettsias son: microorganismos que comparten características tanto de las bacterias como de los virus. Al igual que las bacterias, las rickettsias tienen enzimas y paredes celulares, utilizan oxígeno y pueden ser controladas o destruidas por los antibióticos. Al igual que los virus, pueden vivir y multiplicarse sólo dentro de las células. (Figura 1) Las rickettsias normalmente viven en ácaros, garrapatas, pulgas o piojos y pueden transmitirse a los humanos a través de las heces de las pulgas y piojos o por la saliva de las garrapatas al momento de alimentarse.

El ciclo intracelular de las rickettsias ha sido extensamente estudiado por análisis ultraestructurales. Por ejemplo la *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas se adhiere al menos a una célula huésped receptora Ku70. (Martinez et al. 2005) Este receptor se une a una proteína rickettsial identificada como ompB y una vez unida a la superficie de la célula de la rickettsia induce la fagocitosis y entra a la célula huésped polimerizando actina. (T. S. Walker & Winkler 1978; Martinez & Cossart 2004; Uchiyama 2003; Uchiyama et al. 2006)

Suelen reproducirse dentro de las células que revisten los pequeños vasos sanguíneos y, en consecuencia, dichos vasos se inflaman (vasculitis) o se obstruyen causando permeabilidad por lo que se comienza a diseminar la sangre dentro de los tejidos que los

rodea causando así petequias, erupciones o maculas y vasodilatacion. (Merck Sharp & Dohme 2005)

### **Rickettsiae y artrópodos**

Rickettsiae son comúnmente asociadas con los artrópodos, los cuales pueden ser vectores, reservorios y/o reproducir a la bacteria. El principal vector y reservorio de la fiebre manchada de las montañas rocosas (FMRR) es la garrapata. Rickettsiae son capaces de infectar y multiplicarse en casi cualquier órgano del hospedero invertebrado. Cuando los ovarios y los oocitos de una garrapata hembra se infectan, las rickettsiae pueden ser transmitidas de manera transovarial a su progenie. El porcentaje de huevecillos infectados de una hembra infectada puede variar dependiendo de factores que están aún por elucidarse. (Burgdorfer & Varma 1967; Burgdorfer & Brinton 1975)

Una vez infectado el huevecillo, permanece infectado durante todos los estadios de la garrapata es decir se presenta una transmisión transestadial. Al infectarse la glándulas salivales de la garrapata esta puede infectar a su hospedero vertebrado vía saliva durante la hematofagia, por lo tanto todos los estadios; larval, ninfa y adulto pueden ser potenciales infectivos para su hospedero vertebrado. (D Raoult & Roux 1997) También se han observado transmisión sexual en especies de garrapatas como *Ixodes ricinus* y *Dermacentor andersoni* (C. B. Philip & R. Parker 1933; S. F. Hayes et al. 1980). Cuando las garrapatas sufren de mucho tiempo de inanición la rickettsia no muere solo altera alguna de sus propiedades. Como es el caso de *R. rickettsii* que pierde su virulencia para infectar cuyos en garrapatas *Dermacentor andersoni* pero al incubar esas mismas garrapatas a 37°C por 24 o 48 hr o se realimentan de animales de laboratorio la bacteria recupera su virulencia original, a esto se le llama reactivación. (Spencer & RR Parker 1923) Es por eso que las garrapatas son consideradas como el principal reservorio de rickettsiae. (**Tabla 1**)

Otro artrópodo responsable de causar otra rickettsiosis son los ácaros del genero *Allodermanyssus*, relacionado con el ratón *Mus musculus* que de manera accidental el acaro atacan al humano transmitiendo *R. akari*. El ratón es considerado el reservorio natural de *R. akari*; el acaro puede también serlo y además es el vector.(D Raoult & Roux 1997)(Huebner et al. 1947)

El piojo humano de cuerpo (*Pediculus hominis corporis*) es el vector de *R. prowazekii* y su principal reservorio es el humano. Los piojos son extremadamente específicos con su hospedero, pasan todo su ciclo en el mismo. La transmisión de la bacteria no se da por la picadura del artrópodo, esto se trasmite por la contaminación de las heces en la lesión causada por la picadura. Cuando la rickettsia es ingestada por el piojo estas infectan las células epiteliales del intestino estas se multiplican rápidamente hasta que las células epiteliales crecen demasiado y revientan liberando una cantidad masiva de rickettsiae en el lumen y posteriormente en las heces que pueden permanecer infectivas por hasta 100 dias. Esta infección en el piojo puede llevarlo hasta la muerte. El piojo de humano

(*Pediculus humanus capitis*) de cabeza, no ha sido implicado como vector de tifo epidémico. Además otro reservorio descrito es la ardilla voladora *Glaucomys volans volans*, en los Estados Unidos. Pulgas y piojos de la ardilla voladora resultaron infectados. (M. F. Bozeman et al. 1975).

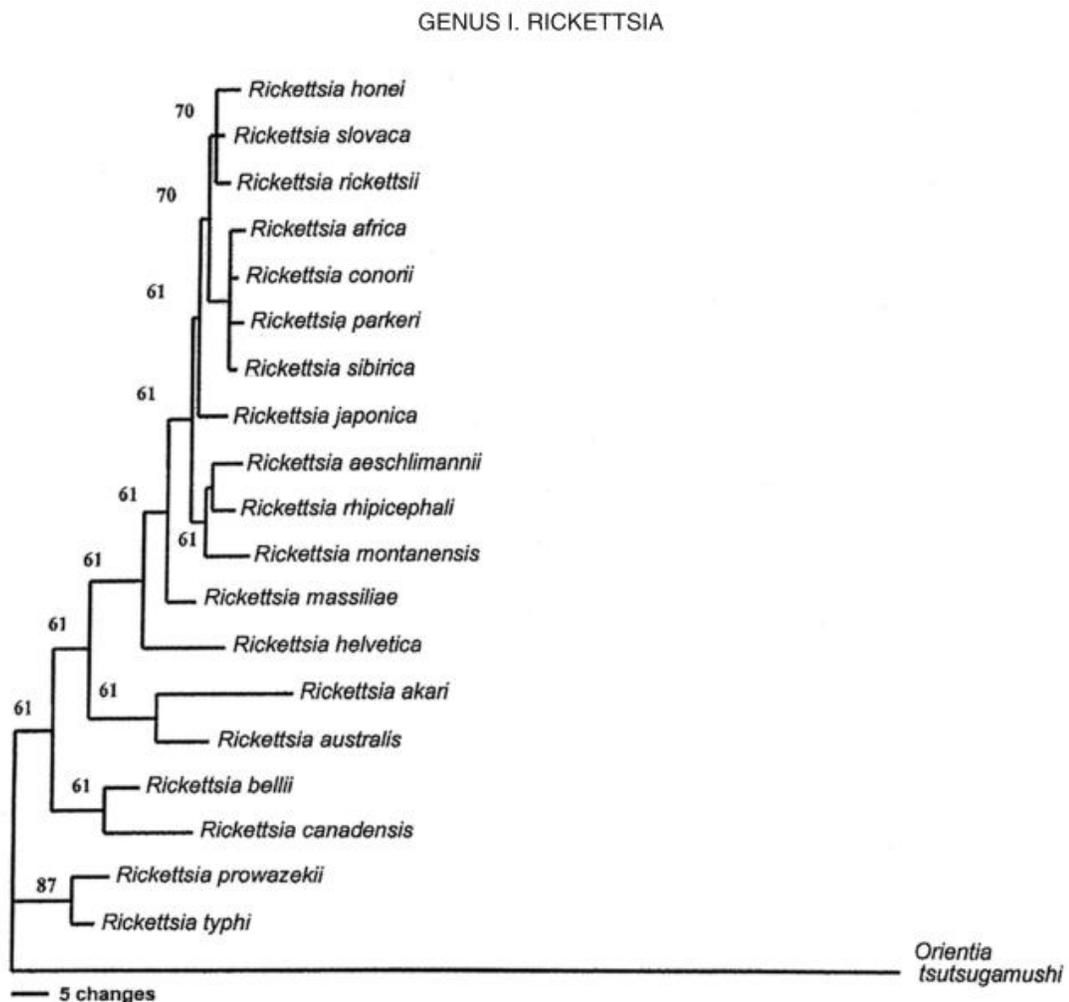
Diferentes especies de pulgas son consideradas vectores de *R. typhi* el agente etiológico de tifo murino, asociado también con *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*, actuando como los reservorios primarios. Rara vez existe una transmisión transovarial de *R. typhi* in pulgas. (Farhang-Azad et al. 1985). Cuando la pulga ingiere sangre infectada la rickettsiae entre en el epitelio del intestino se propaga y disemina y subsecuentemente es excretada en las heces. Una vez infectada la pulga permanece infectada durante todo su ciclo. Trasmisiones por aerosoles o contaminación de heridas de estas heces infectadas son las causas de brotes de tifo murino. (Traub & Wisseman 1978)

**Tabla 1. Asociación de género de garrapata con especie de rickettsiae (D Raoult & Roux 1997)**

<b>Genero de Garrapata</b>	<b>Rickettsia</b>
<i>Rhipicephalus</i>	<i>R. conorii</i> <i>R. rhipicephali</i> Strain S <i>R. honei</i> <i>R. massiliae</i> Bar 29 JC880
<i>Dermacentor</i>	<i>R. rickettsii</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. japonica</i> <i>R. slovacae</i> <i>R. bellii</i> <i>R. montanensis</i> <i>R. rhipicephali</i> <i>R. peacockii</i>
<i>Amblyomma</i>	<i>R. africae</i> <i>R. parkeri</i> "R. amblyommii" <i>R. rickettsii</i> <i>R. texiana</i> Unnamed rickettsia
<i>Haemaphysalis</i>	<i>R. japonica</i> HL-93 <i>R. rickettsii</i> <i>R. canadensis</i> <i>R. conorii</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. bellii</i>
<i>Ixodes</i>	<i>R. helvetica</i> <i>R. australis</i> <i>R. rickettsii</i> <i>R. japonica</i> <i>R. honei</i>
<i>Hyalomma</i>	<i>R. sibirica</i> strain mongolotimonae <i>R. aeschlimanni</i>
<i>Ornithodoros</i>	<i>R. bellii</i>
<i>Argas</i>	<i>R. bellii</i>

Las garrapatas también pueden usarse como herramienta epidemiológica para detectar la presencia de patógenos en un área específica, además de que brinda la posibilidad de descubrir rickettsiae de patogenicidad desconocida. (Parola & D Raoult 2001)

Existen reportes de presencia de rickettsias en diferentes invertebrados como son los ácaros, insectos y sanguijuelas en el Japón(Kikuchi & Fukatsu 2005) y que causan enfermedades también a plantas como en el caso del la “papaya bunchy top” que se ah identificado a una rickettsia muy parecida a *R. belli* (99.1% de similitud en su secuencia de *gltA*).(M. J. Davis et al. 1998)



**Figura 2. Filogenia de las Rickettsiae. Relacion filogenética de los organismos de la familia Rickettsiaceae basados en las secuencias de DNA del gen 16S rRNA. (Yu, X.J., Walker 2005)**

## **Rickettsiosis en la historia**

Las rickettsiosis específicamente el tifo representan una de las enfermedades infecciosas reconocidas más antiguas y más recientes. Los historiadores médicos se han basado en las descripciones que más se asemejan a las manifestaciones clínicas actuales, descripciones epidemiológicas y a las condiciones ecológicas que han sido descritas en documentos históricos imperfectos. Esto hace que el origen preciso de las rickettsiosis sea aun desconocido, pero al igual que muchas otras enfermedades infecciosas, transmisibles, de carácter epidémico, es altamente probable que tenga su origen en África, cuna de la humanidad. (Didier Raoult et al. 2004)

El termino tifus derivado del griego *typhos* cuyo significado literal es el de “humor” fue empleado por primera vez por Hipócrates en el siglo V a.C, no para denominar a la enfermedad que hoy conocemos por ese nombre, si no para designar un estado clínico caracterizado por un estado de “confusión intelectual” o estupor. (Conlon 1999) Varios autores señalan que las primeras evidencias de epidemias de tifo exantemico las escribió Tucídides, (Cunha 2004) el padre de la historia, cuando en su libro *Historia de las guerras del Peloponeso*, se refiere a la peste que asoló a Atenas en 460 a.C., durante la guerra con Esparta, en la cual murió tercera parte de la población, incluyendo a Pericles. La Epidemia según Tucídides, llego procedente de “un lugar al sur de Egipto” que probablemente es la actual Etiopía, donde se habría originado. (Perez Tamayo 1985) Otra antigua descripción del tifo fue encontrada en un monasterio en Salerno, Italia y data del año 1083, (Sylbalski 1999) sin embargo debido a la pobre calidad de las descripciones clínicas de esa época no es muy claro, y es difícilmente diferenciada de la tifoidea. (Ewald 1994)

La primera descripción definitiva del tifo epidémico basado en los brotes ocurridos en Italia los años 1505 y 1528, fue publicada en un libro llamado *De Contagione* por Fracastorius en 1546 y la diferencio claramente de la peste. En 1676, Von Zavorziz escribió un libro referente al tifo llamado *The Infection of Military Camps*. (Hansen & Freney 1996) Una epidemia de tifo se presento durante el asedio en Granada, España 1489-1492, pero fue hasta 1789 que Huxham diferencio al tifo de la fiebre tifoidea basándose en la aparición de erupciones en la piel, y el francés Boissier de Sauvages lo nombro tifo exantemático por primera vez en 1760. (Didier Raoult et al. 2004)

La diferenciación definitiva entre fiebre tifoidea y el tifo, fue realizada en 1836 en los Estados Unidos por un investigador llamado Gerhard. Este claramente distinguió las dos enfermedades basándose en el análisis patológico; observando que los pacientes que morían de tifo no tenían ulceraciones de Peyer, al contrario con las observaciones de los pacientes con tifoidea.

Las primeras observaciones de Nathan Brill realizadas en Nueva York a finales de 1800, acerca de una forma recrudescente del tifo, fueron después probadas y publicadas en 1910 de ahí el nombre de enfermedad de Brills, ese mismo año J. E. Paullin realizo la

primer descripción de la fiebre tifo murina e identifico una fiebre leve de tifo ocurrida en Atlanta Georgia. Antes que la enfermedad fuera definitivamente separada de la fiebre epidémica por tifo requirió de casi dos décadas de investigaciones epidemiológicas, ecológicas y de un laborioso trabajo de laboratorio.

En 1906 el Dr. Howard T. Ricketts publico el artículo que identificaba a la garrapata *Dermacentor occidentalis* como el transmisor de la fiebre manchada de las montañas rocosas.

Las investigaciones del Dr. Howard T. Ricketts, se basaron en una publicación de Wilson y Chowning en el primer volumen de *The Journal of Infectious Disease* de 1904 en el cual describieron la severidad de la fiebre manchada de las montañas rocosas: incluyendo las características clínicas (periodo de incubación, tiempos de malestar, síntomas, erupciones), la distribución geográfica de los casos y la negativa de poder realizar un cultivo bacteriano. (Wilson & Chowning n.d.) La mayoría de los casos ocurrieron entre el 15 de Mayo y el 15 de Junio entre hombres de 20 a 40 años de edad, relaciono las actividades en exteriores y en falda de montañas con la exposición a la enfermedad. Las descripciones de Wilson y Chowning mencionan la presencia de protozoarios intraeritrocíticos en pacientes y en ardillas de suelos de Columbia, también relacionaron la hipótesis de las mordeduras de garrapatas como el medio de transmisión, estas observaciones fueron ampliamente reconocidas y subsecuentemente rechazadas por otros expertos que no lograron encontrar protozoarios en la sangre de los pacientes. (David H Walker 2004)

Las investigaciones del Dr. Ricketts en 1906 revelaron los principios más importantes relacionados con las rickettsias (particularmente con *Rickettsia rickettsii*) y la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. El Dr. Ricketts publico 3 reportes y posteriormente un artículo *Observations on the Virus and Means of Transmission of Rocky Mountain Spotted Fever* en 1907, en ellos describe la transmisión experimental de la infección de la sangre de pacientes a conejillos de indias y monos, el mantenimiento de el agente mediante la vía de pasaje animal en serie y la habilidad de las garrapatas hembras de adquirir la infección de un conejillo de india infectado de manera experimental y la subsecuente transmisión de la enfermedad al alimentarse de otro conejillo de indias. También reporto en esos 3 artículos la no filterabilidad de el agente; la diseminación de la infección en humanos y en animales infectados de manera experimental; la inmunidad en monos y conejillos de india en estado convaleciente; y el ciclo de vida de la garrapata vector. No se observaron protozoarios en la sangre de pacientes ni en los animales infectados de manera experimental. El conocimiento de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en el año de 1906 avanzo de manera extraordinaria en menos de un año gracias al trabajo de Ricketts. (Walker DH, 2004)

En esta época la investigación en México estaban enfocadas en el tifo epidémico y murino que se aseguraba que existían de manera concomitante. También surgían confusiones al no poder saber con certeza de que cepa de rickettsia estaban hablando ya

se conocían que existían tres tipos la causando de tifo epidémico, tifo murino y de la fiebre manchada, sin embargo otros investigadores mencionaba nombres como tifo endémico, tifo epidémico, enfermedades de Brills y tifo Mexicano para denotar la fiebre por tifo murino.

En 1929 el epidemiólogo Kenneth Maxcy publica sus postulados indicando que las ratas o ratones pueden servir como reservorios del tifo murino, también el sospecho que los insectos vectores eran las pulgas, ácaros o garrapatas. Estas hipótesis fueron demostradas en 1930 por Dyer y sus colaboradores cuando el agente etiológico se logro aislar a partir de una rata encontrada en el local de un enfermo de tifo murino usando el cerebro de este roedor para inocular conejillos de india y también las pulgas obtenidas de ese mismo roedor, obteniendo la rickettsia causante. (Dyer, R et al. 1931)

El reservorio murino y la transmisión de la rickettsia fueron establecidos; se noto que los síntomas clínicos eran similares a los del tifo epidémico, mas leves en el curso de la infección, y generalmente no fatales a excepción de los adultos mayores. El tifo epidémico estaba usualmente asociado con una enfermedad severa y fatal. (Maxcy 1926) Las similitudes entre el tifo epidémico y el tifo murino eran muy aparentes. Gracias a los trabajos realizados por Marcy, Dyer, Paullin, Zinsser, Castañeda, Mooser y Anderson, características epidemiológicas, ecológicas y clínicas fueron clarificadas. Las rickettsias del tifo epidémico (*R. prowazeki*) y tifo murino (*R. typhi mooseri*), tienen las mismas características de tinción y morfológicas. La reacción en los conejillos de india fueron similares aunque en el caso de las rickettsias murinas, causa una inflamación mas difusa de la túnica vaginales en el macho y aglomerados de rickettias llamadas cuerpos de Neill-Mooser. También se noto que los animales que se recuperaban de tifo murino eran inmunes a la rickettsia de tifo epidémico y viceversa. Los franceses y otros investigadores europeos, en base a datos epidemiológicos rápido notaron que los pacientes naturalmente convalecientes de tifo murino eran inmunes a la enfermedad epidémica más severa. (T. E. Woodward 1982)

Durante mediados de 1930 Zinsser y sus colaboradores en Boston y New York, evaluaron a pacientes con la enfermedad de Brill. Aparentemente las manifestaciones clínicas eran mas leves que la del tipo clásico sin embargo una observación extraña se presentaba en los pacientes al realizarse la prueba del antígeno proteus OX19. (H Zinsser & M. Castaneda 1933) Epidemiológicamente se noto que en la mayoría de los pacientes (95%) con la enfermedad de Brill's tenían un historial de haber contraído el tifo clásico en países con epidemias en Europa en una época temprana de sus vidas. Zinsser asumió correctamente que la enfermedad de Brill's era simplemente una forma recurrente de tifo epidémico. Su concepto incluía la hipótesis correcta que *R. prowazekii* se mantiene viable en el hospedero humano por muchos años y que es capaz de causar relapsos. Esta enfermedad en la actualidad es llamada el mal de Brill-Zinsser

Con la revolución de los análisis moleculares de fragmentos diminutos de tejidos antiguos (ej. ADN en pulpa dental, huesos, o restos momificados) se han verificado o

excluido algunas de las hipótesis más antiguas. (M Drancourt et al. 1998) (Didier Raoult et al. 2006)

De toda las enfermedades infecciosas que el mundo a sufrido, solo unas cuantas han alterado realmente la historia de la humanidad. Tomando en cuenta enfermedades como la viruela, la peste, tuberculosis y VIH, existen suficientes argumentos que ponen al tifo epidémico como el factor que ha decidido el rumbo de más guerras que cualquier soldado o general. (Hans Zinsser 1935) (Didier Raoult et al. 2004)

En el siglo XII, durante la conquista de Granada, se le llamó “tabardillo”, y causó una mortalidad muy alta. En América, pudo existir antes de la conquista, pues se han encontrado en Perú piojos en Momias. (Didier Raoult et al. 2004)

Investigaciones más acuciosas nos revelan que el tifus exantemático ya existía en Mesoamérica antes de la llegada de los españoles. Los indígenas lo conocían con el nombre de matlazahuatl, de matlat (red) y Zahuatl (erupción), es decir erupción en forma de red. (Ocaranza et al. 1981)

En 1916 el Dr. Henrique Rocha de Lima describió y nombro por primera vez a este microorganismo como rickettsia en honor al Dr. Howard Ricketts y al Dr. Stanislaus Von Prowazek de ahí el nombre *Rickettsia prowazekii* causante del tifo epidémico que al cual lo consideran como el segundo microorganismo que más a matado gente en la historia de la humanidad, se dice que en la primera guerra mundial, murieron más hombres por tifo que por las batallas. También se ha demostrado que el tifo fue una de las causas de la derrota de las tropas de Napoleón en territorio ruso en 1812, cuando al realizar excavaciones en la región de Lituania, encontraron una de las fosas comunes donde se colocaban los cadáveres en esa guerra, de esos cuerpos momificados, se extrajo de la pulpa de los dientes DNA y se diagnostico mediante PCR usando oligonucleótidos específicos para DNA de rickettsia, las secuencias de estas amplificaciones dieron como resultado una homología a *Bartonella quintana* y *R. prowazekii*. (Raoult 2006). Esta investigación confirmo la hipótesis que se tenían sobre la existencia de epidemias de tifo en esta época.

Hay autores que mencionan que el tifus fue una de las causas de las grandes epidemias y holocaustos que causaron la muerte de tres cuartas partes de la población precolombina, (Alcántara VE, 2004) (Johnson CW, 2006) sin embargo esto no ha podido ser demostrado por la gran similitud de síntomas con otras enfermedades febriles además de la falta de una investigación paleo-microbiológica para demostrar esto.

### **Rickettsiologos en México**

Cabe mencionar que el padre de la Rickettsiologia el Dr. Ricketts, se instaló en el Instituto Bacteriológico Nacional y en el Hospital General. Con su asistente Russell Wilder anunció el descubrimiento del microorganismo causal en los piojos (*Pediculus corporis*) y sangre de los enfermos. Sin embargo, no pudieron nunca cultivar el bacilo a pesar de tenerlo identificado. Ricketts y Wilder observaron bacilos teñidos con Giemsa

en la sangre de los pacientes a los doce días de la enfermedad, con lo que aportaban una prueba directa para establecer el origen bacteriano de la enfermedad a diferencia de lo que propuso Nicolle quien defendía una causa viral a consecuencia de la filtrabilidad del agente patógeno. Casi a la vez, el austriaco Stanislaus von Prowazek, que dirigía el Instituto de Enfermedades Tropicales de Hamburgo, fue comisionado para el estudio del tifus exantemático en Belgrado y Constantinopla. Confirmó los hallazgos de Ricketts respecto al vector y también pudo observar el agente causante. Al igual que Ricketts se infectó y falleció en 1915. Un año más tarde el brasileño Henrique de Rocha-Lima aisló en el mismo Instituto el agente causante del tifus transmitido por el piojo y denominó a la bacteria *Rickettsia prowazekii* en homenaje a los dos fallecidos. Más tarde en México Hermann Mooser estableció la diferencia entre el tifus exantemático y el tifus murino, producido por el *R. typhi* (mooseri) y transmitido por la pulga de la rata. Poco después el 3 de mayo de 1910 falleció por esta misma enfermedad en el Hospital Americano de México a consecuencia, quizás, de las heces de piojos infectados (Fresquet, JL 2004)

Entre las aportaciones del Dr. Ricketts, identificó que la causa de las fiebres manchadas en el estado de Montana, Estados Unidos eran las garrapatas (*Dermacentor andersoni* (antes *occidentalis*)) y hasta organizó un programa de control del artrópodo en esta región.

En México existe evidencia rickettsiosis de tipo tifus y de fiebres manchadas desde 1893. Las primeras investigaciones de este problema de salud pública fueron realizadas entre las décadas de los 1920 a los 1950. Entre 1922 y 1930 un promedio de de 670 muertes por tifus eran reportadas anualmente. Inclusive entre 1931 y 1940 fueron reportados mucho más casos de tifo epidémico.

En 1941 el estado de Nuevo León fue de los más afectados por tifo epidémico con 1166 muertes a causa de esta enfermedad. (Secretaría de salubridad, 1979)

En 1944 *Rhipicephalus sanguineus* fue identificado como el vector de rickettsiosis en el estado de Sinaloa (Ortiz) y también fue reportado en el Estado de San Luis Potosí.

El vector de rickettsiosis en el estado de Veracruz fue identificado como *Amblyomma cajennense*. (Sub secretaría de Salubridad, 1979)

En 1947 se publicó un trabajo sobre la distribución de rickettsiosis en México en la cual reportaron aislamientos de cepas de tifo murino en los estados de Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Zacatecas y la ciudad de México. Cepas clásicas en Hidalgo, México, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Ciudad de México. (Figura 3)(Bustamante & Varela 1947)

Más reciente en Mayo de 1997 hubo un brote de 96 casos de tifo endémico en el municipio de Montemorelos, Nuevo León, en el cual el grupo de edad más afectado fue de 25-44 años en su mayoría mujeres, sin embargo la técnica utilizada para diagnosticar estos casos fue Weil-Felix la cual es una técnica altamente inespecífica. (SSA, Indre).

Otros casos de rickettsiosis en el país han sido reportados en boletines de secretaria de salud, con pobre difusión.

## Casos confirmados en México por técnicas de biología molecular

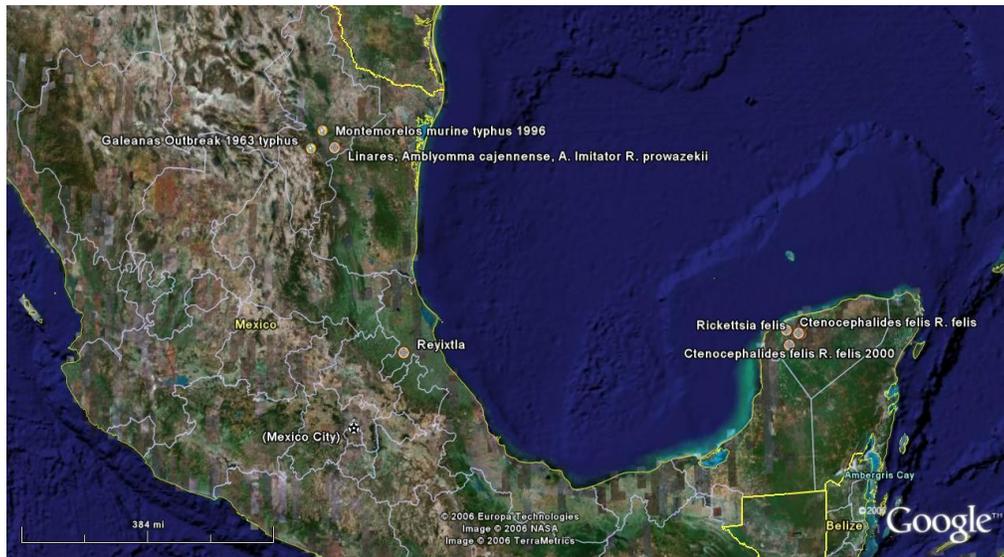
En el estado de Yucatán en Abril del 2006 se documento un caso de fiebre manchada de las montañas rocosas, el cual fue publicado en *Emerging Infectious Diseases*, el caso fue fatal y además identificaron por PCR el agente etiológico *Rickettsia rickettsii*. (Figura 4) (Zavala-Castro 2006)

En Nuevo León específicamente en el Municipio de Linares, por primera vez se aisló una *Rickettsia* utilizando técnicas modernas de cultivo celular y biología molecular. Se identifico la rickettsia comparando material genético con la base de datos de instituto nacional de biotecnología de los estados unidos. Se caracterizo la ultra-estructura usando técnicas de microscopia electrónica. Este fue el primer caso publicado de un aislamiento por cultivo celular en México. (Medina-Sánchez, 2005)

Sin embargo en México la investigación acerca de las fiebres por *rickettsia* o rickettsiosis, no ha sido ampliamente estudiada, quizás debido a la necesidad de infraestructuras, modernas, equipadas y controladas, para el manejo de este microorganismo, que está considerado como un agente de bioseguridad nivel 3.



**Figura 3. Distribución de rickettsiosis en México en los años cuarenta.**



**Figura 4. Distribución de estudios recientes en el país.**

## **Diagnóstico de las enfermedades Rickettsiales**

En la actualidad existen herramientas de diagnóstico que permiten identificar de manera exacta que tipo de infección rickettsial presenta el paciente, sin embargo todo empieza con la observación y la presentación clínica de cada paciente. Por lo tanto es de gran importancia conocer todas las variables en las manifestaciones clínicas para poder decidir un rápido y eficaz tratamiento.

## **Presentación Clínica y Observaciones**

Las enfermedades como el tifo epidémico, tifo murino o la fiebre de las montañas rocosas FMMR y la en la antigüedad fueron descritas solamente por evidencia clínica. Usualmente y en primera instancia cuando la atención médica atiende a un paciente en la etapa temprana de la enfermedad, es difícil de distinguir de otras enfermedades virales. Durante los primeros 3 días los síntomas más comunes son: Fiebre, dolor de cabeza, malestar, mialgias, náuseas, vómito, y anorexia.

El paciente se vuelve progresivamente más enfermo cuando la lesión e infección vascular avanza. Es un hecho que solo un tercio de los pacientes fueron diagnosticados con FMMR en la etapa temprana de la enfermedad de manera y solo a un tercio se le da un tratamiento apropiado logrando una consulta ambulatoria. Al final de la primera semana o durante la segunda semana las manifestaciones severas se desarrollan si el tratamiento no fue el apropiado aquí es cuando el paciente es referido a un centro de referencia epidemiológica, y un especialista terciario se hace cargo, y se admite a una unidad de cuidados intensivos. (Harrison, Chapter 167) (Figura 5).



**Figura 5. Caso pediátrico de fiebre mancha en Hermosillo, Sonora, México.**  
(Obtenida del Dr. Ángel Niño-Medina ISSTESON)

### **Diagnostico por serología**

Los ensayos serológicos son las pruebas de diagnostico más simples y accesibles de realizar. Una de ellas, la prueba de Weil-Felix (Weil & Felix 1916) fue la primera que se utilizo para el diagnostico de las rickettsiosis. Este ensayo está basado en la detección de anticuerpos de varias especies de *Proteus* que contienen antígenos que reaccionan de manera cruzada con epitopes de antígenos de miembros del genero *Rickettsia* con la excepción de *R. akari*. (M. R. Castaneda 1935; La Scola & D Raoult 1997) La cepa *Proteus vulgaris* OX-2 reacciona fuertemente con sueros de personas infectadas con rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, excepto con *R. rickettsii*; la cepa de *Proteus vulgaris* OX-19 reacciona con sueros de pacientes infectados con rickettsiae del grupo tifo y con FMMR. De manera subsecuente, la cepa OX-K de *Proteus mirabilis* aglutina el suero de pacientes infectados con *rickettsia* esto se debe a que tiene epitopes comunes en los lipopolisacaridos que reaccionan con IgG e IgM de la mayoría de los pacientes con FM.(Amano et al. 1992) Usando el ensayo o prueba de Weil-Felix, la aglutinación de anticuerpos se puede detectar después de 5 a 10 días después de sentir el malestar de la infección y los anticuerpos detectados son principalmente las inmunoglobulinas M (IgM) de tipo (1,2). Pacientes con la enfermedad de Brill-Zinsser o infectados con *R. akarii* usualmente no presentan ninguna aglutinación. Sin embargo se ha demostrado que la prueba de Weil-Felix tiene pobre sensibilidad y especificidad. Aunque existe una buena correlación entre los resultados de la prueba de *Weil-Felix* y el ensayo de inmunofluorescencia (IFA) en la detección de anticuerpos. Por lo tanto esta

prueba solo debe de usarse como la primera línea de diagnóstico presuntivo en laboratorios de hospitales rudimentarios.

Con el desarrollo de las técnicas para el cultivo de *Rickettsias*, la prueba de fijación de complemento (FC) fue adaptada para la detección de anticuerpos específicos para *rickettsiae*. Las partículas de antígeno rickettsial en la prueba de FC son específicas para especies del grupo de las fiebres manchadas (GFM) y grupo tífus (GT), pero reacciones cruzadas se han observado entre los anticuerpos de los grupos observados. (Shepard et al. 1976) Esta prueba está basada en la detección de la interacción entre los anticuerpos y las células rickettsiales completas. (Fiset et al. 1969) Sin embargo esta prueba no ha sido ampliamente usada porque se necesita una gran cantidad de antígeno rickettsial purificado y este antígeno no está disponible de manera comercial. (La Scola & D Raoult 1997) Existe también la prueba de aglutinación de látex, que consiste en perlas de látex envueltas con una sustancia que contiene antígeno sensibilizado con eritrocitos. Esta prueba es rápida (15 minutos) y no requiere instrumentación elaborada pero si es necesario que se realice dentro de la primera semana después de presentar los síntomas ya que la presencia de anticuerpos desaparece después de 2 meses.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en un principio fue usada para la detección de anticuerpos contra *Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowazekii* (Halle et al. 1977) pero posteriormente fue adaptada al diagnóstico de FMMR y de tífus de los matorrales (*O. tsutsugamushi*). El uso de esta técnica es altamente sensible y reproducible además permite la diferenciación de anticuerpos IgG y IgM.

El estándar de oro para el serodiagnóstico de enfermedades rickettsiales es la inmunofluorescencia indirecta (IFA). Esta técnica ha sido adaptada a un formato en micro que permite el serodiagnóstico rickettsial de anticuerpo contra diferentes antígenos (hasta nueve antígenos) con la misma gota de suero. La IFA permite la detección de anticuerpos tanto IgG como de IgM. La identificación por IFA de anticuerpos IgM contra diferentes especies de *rickettsiae*, indica una fuerte evidencia de una infección activa reciente, aunque el diagnóstico puede ser ocultado por el fenómeno de prozona (falso negativo debido a la alta concentración de antígeno o anticuerpo). (R. N. Philip et al. 1977) Esta técnica tiene el inconveniente de que puede ser afectada por factores reumatoides, por lo tanto requiere del uso de absorbentes de estos factores antes de realizar la determinación de IgM. Estudios recientes muestran la importancia de establecer un umbral de positividad o punto de corte en zonas endémicas para evitar de esta manera los falsos positivos. (Kantsø et al. 2009)

Los ensayos de inmunowestern- blot con geles electroforados en dodecil sulfato de sodio y antígenos electro absorbidos son una herramienta seroepidemiológica muy efectiva y útil para la confirmación de resultados obtenidos en pruebas convencionales. Es especialmente útil para diferenciar los falsos positivos creados por reacciones cruzadas de anticuerpos.

## **Aislamiento de Rickettsiae**

En el pasado solamente los laboratorios de investigación con instalaciones de bioseguridad 3 y personal con amplia experiencia en el cultivo de rickettsiae eran capaces de aislar rickettsias de muestras clínicas. En la actualidad el desarrollo de sistemas de cultivo celulares para aislamiento viral ha servido para incrementar el número de laboratorios equipados para aislar rickettsias.

El aislamiento de rickettsias puede ser realizado con diferentes muestras como plasma, tejido de necropsias, biopsias de piel y directamente de artrópodos.

El aislamiento en huevos embrionados de pollo fue usado ampliamente en el pasado, pero ahora ha sido remplazado por sistemas de cultivo celular. (H. R. Cox 1938)

## **Cultivo celular.**

El aislamiento de rickettsia en cultivo celular se describió hace 60 años (Nigg 1932) y es en la actualidad cuando más se utiliza para el aislamiento de rickettsias de muestras clínicas. El aislamiento de *R. rickettsii* directamente de sangre se ha logrado usando cultivo de monocitos primarios. Después se utilizaron fibroblastos L929 de ratón en tubos de cultivo para aislar *R. rickettsii* y *O. tsutsugamushi* de sangre. (Kaplowitz et al. 1983; Tamura et al. 1984) Más adelante se desarrolló un ensayo comercial que consiste en el uso viales shell, para cultivar citomegalovirus que fue después adaptado para detectar *R. conorii*, con este ensayo se es capaz de detectar el microorganismo entre 48 y 72 horas en la mayoría de los casos. (Marrero & D Raoult 1989) Debido a la pequeña superficie cubierta con una monocapa de células vivas (Vero), y mediante la fuerza centrífuga, hace que el material infectado con rickettsiae entre en contacto con estas células logrado así una buena inoculación en proporción a las células disponibles y las rickettsias en el material biológico. (Weiss & Dressler 1960) En algunos laboratorios de la unión europea esta técnica se realiza de rutina para el aislamiento de rickettsias de muestras humanas (plasma o tejido) o de hemolinfa de artrópodos. (F Bacellar et al. 1995; Kelly et al. 1991) Se recomienda usar heparina como anticoagulante en sangre, evitando EDTA o citrato de sodio debido a que estos provocan el desprendimiento de la monocapa de celular. Se ha inclusive demostrado que es posible aislar rickettsiae de muestras almacenadas a 4°C o a temperatura ambiente y observado un crecimiento en el caso de *R. conorii* desde el 3 día después de la inoculación, es decir antes de la seroconversión. (La Scola & D Raoult 1997)

## **Identificación de Rickettsiae**

En años recientes el campo de la investigación de las enfermedades rickettsiales ha evolucionado a pasos agigantados, en particular por los avances tecnológicos en el área de genética molecular. (Parola, 2005).

Los métodos tradicionales usados en bacteriología, no pueden ser usados con las rickettsiae debido a que son organismos de naturaleza estrictamente intracelular. Técnicas como la MIF (microinmunofluorescencia indirecta) usa como fundamento el hecho que 3 proteínas superficiales de alta masa molecular en el grupo de los rickettsiales (*ompA*, *ompB*, *PS120*) contienen epitopes específicos a especies, con esto es posible serotipificar rickettsiae mediante la comparación. El uso de MIF fue considerado por mucho tiempo como el método de referencia para la identificación de rickettsiae. (D Raoult & Roux 1997)

En la actualidad con el desarrollo de la biología molecular y la aplicación de métodos robustos de identificación molecular, técnicas como la serotificación por MIF deben de ser reconsideradas, inclusive cuando se utilizan un IFA con anticuerpos monoclonales para la serotipificación. Los resultados que arroja una tipificación genética son objetivos y definitivos. (Parola, 2005)

El uso del PCR para la detección e identificación de rickettsia es cada vez más común en laboratorios de referencia en todo el mundo incluyendo aquellos países en vías de desarrollo. La capacidad de poder usar diferentes muestras clínicas para poder amplificar DNA rickettsial es una de sus ventajas. Principalmente se utilizan biopsias de piel y células mononucleares de sangre periférica. La recomendación es el uso de sangre periférica colectada de tubos con EDTA o citrato de sodio, de la cual se han obtenido resultados satisfactorios para la identificación de *O. tsutsugamushi*, *R. rickettsii*, *R. typhi* y *R. prowazekii*, *R. conorii* a partir de sangre total, (Furuya et al. 1995) (Furuya et al. 1993)(Schattner et al. 1992)(Sugita et al. 1992)(Tzianabos et al. 1989)(De Sousa et al. 2003)

Con el desarrollo de los secuenciadores de nucleótidos automatizados de productos de PCR ahora es una técnica rápida, conveniente y sensible para la identificación de rickettsias. El uso de secuencias de *16S rRNA* para realizar comparaciones e identificaciones no es útil en la taxonomía de rickettsiae debido a que existe una similitud mayor del 97% entre cualquiera de las dos taxas. Las secuencias de genes como el de la proteína *17 kDa*, para la identificación de *R. rickettsii*, *R. prowazekii*, y *R. japonica*. La secuencia del gen que codifica el antígeno *56-kDa* es usado para identificar *O. tsutsugamushi*. Otros genes como *gltA*, *ompA*, *ompB* y *sca4* son usados para comparar e identificar especies. (Fournier et al. 2003; R. L. Regnery et al. 1991)

Una de las dificultades en el uso de herramientas moleculares para la identificación de especies rickettsiales, es la determinación del límite en el porcentaje de divergencia entre las secuencias de los genes para definir una especie, subespecie o una cepa. De acuerdo a la publicación de la guía genética para la clasificación de una especie de nueva de *Rickettsia* es necesario que el organismo aislado no tenga más de uno de los siguientes grados de nucleótidos similares con la especie validada con mayor homología:  $\geq 99.8$  y  $\geq 99.99\%$  para el gen *rrs* y *gltA* respectivamente, y cuando el amplificado sea del  $\geq 98.8\%$  de homología para el gen *ompA*,  $\geq 99.2\%$  para el gen *ompB* y  $\geq 99.3\%$  gen *sca4* esto según el grupo de investigadores franceses liderados por el Dr. Raoult. Por lo que

establece que para nombrar una especie de *Rickettsia* esta debe ser sustancialmente diferente una de otra.(Fournier et al. 2003)

El criterio propuesto para el establecimiento de una nueva especie en el caso de las *rickettsiae* difiere claramente del umbral de divergencia genética establecido de varias de otras bacterias intracelulares que incluyen artrópodos como hospedero y con similar presión selectiva evolutiva (Ejem. *Orientia tsutsugamushi*, *Coxiella burnetti*, y *Ehrlichia chaffensis*). Por lo que, organismos como *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. africae* y *R. parkeri* podrían considerarse como cepas o subespecies en el caso hipotético que fueran clasificadas por los nuevos criterios y pertenecieran a otro género.(Walker 2007)

Por lo que un grupo de expertos taxónomos rechazan este método para diferenciar especies, y mencionan que “el definir los límites de las especies mediante el uso de similitudes de secuencias típicamente encontradas en especies existentes ya nombradas es claramente inapropiado”(Gevers et al. 2005).

Otros expertos proponen que las especies de bacterias se podrían dividir en grupos con más señalados incorporando el concepto de ecotipo y que incorporando el concepto ecotipo podría proveer de bases racionales para delimitar las taxas bacterianas.(Cohan 2002) Esto coincide con el artículo de Eremeeva que menciona que las tecnologías de tipificación molecular es aun el talón de Aquiles de las investigaciones de brotes; también menciona que las herramientas actuales no son lo suficientemente sensibles como para que se realicen de manera rutinaria con muestras clínicas o con garrapatas, por lo tanto existe la necesidad de desarrollar técnicas de diferenciación de detección que sean más baratas, más simples y más robustas. La existencia de nuevas enfermedades y nuevos agentes, que causan brotes se presentan sin objeción en congresos y simposios, sin embargo las herramientas y protocolos se deben de ver como avances que aun requieren de adaptaciones y modificaciones. Por lo tanto la detección molecular y la identificación de una nueva rickettsia se debe considerar como el primer paso de su descripción. Lo que le sigue es el aislamiento y la completa caracterización para poder entender la biología, la genética y la ecología fundamental de este organismo y de la enfermedad que causa. (M. E. Eremeeva 2012)

### **Manifestaciones clínicas**

Exantemas está presente solo en el 14% de los pacientes en el primer día de la enfermedad y 49% durante los primeros 3 días. Maculas de 1 a 5mm aparecen en las muñecas y los tobillos

**Tabla 2. Manifestaciones clinicas de tifo epidemico y tifo murino**

<b>Tifo epidémico</b>		<b>Tifo murino</b>	
<b>Signos y Síntomas</b>	<b>%</b>	<b>Signos y Síntomas</b>	<b>%</b>
Fiebre	100	Fiebre	98
Cefalea	70 - 80	Artralgias	72
Dolor abdominales	31 - 80	Malestar	89
Escalofríos	60 - 82	Nauseas	66
Hepatomegalia	13 - 24	Cefalea	87
Exantema	2 - 70	Vomito	54
Confusión	2 - 8	Mialgias	81
Tos	35 - 80	Dolor lumbar	53
Convulsiones	4	Anorexia	81
Conjuntivitis	45 - 53	Dolor abdominal	51
Ictericia	3 - 17	Escalofríos	81
		Rigidez de nuca	47

**CAPITULO 1. BÚSQUEDA DE SEROPREVALENCIA E  
IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE  
RICKETTSIOSIS Y SUS ARTRÓPODOS VECTORES EN  
EL SUR DE NUEVO LEON, MÉXICO**

# METODOLOGIA

## Área De Estudio

### Nuevo León

El área de estudio fue determinado por los antecedentes históricos de seroprevalencia de rickettsiosis, las áreas seleccionadas para esta investigación fueron los municipios de Allende y Linares, las coordenadas geográficas de las colectas son las siguientes.

La localidad de Loma Alta está situada en el municipio de Linares en el sur del Estado de Nuevo León esta población cuenta con 82 habitantes en su mayoría dedicados a la agricultura y crianza de ganado, otra actividad que se realiza en la zona es la cacería de venado y de jabalí. Este poblado se encuentra a 380 metros sobre el nivel del mar. Su posición geo-referenciada se encuentra en la latitud 24°50'34.18''N, longitud 99°35'22.01''W. El municipio cuenta con un clima seco la humedad máxima es de 45% la mínima de 30% y un promedio de 40% anual la temperatura máxima extrema es de 45°C, la temperatura mínima extrema -8°C y la media anual 12°C y 18°C.

## Estudio Serológico

Las muestras colectadas en este estudio fueron de pacientes residentes del municipio de Linares y que el personal de la secretaria de salud del estado de Nuevo León considero que fueron sospechosas de tener dengue. Usando jeringas desechables y técnicas estériles de colecta se obtuvieron de 3 a 5 ml de sangre por punción ante-cubital.

El suero fue separado por centrifugación y fue almacenado a -20 °C. A cada muestra se le asigno un número y un código relacionado con su edad y sexo. Ensayos de inmunofluorescencia para anticuerpos IgG fueron realizados y una dilución igual o mayor de 1:64 fue considerada positiva. Se realizaron ensayos usando antígeno de *R. prowazekii* y *R. typhi* a una dilución de 1:64; los positivos fueron posteriormente diluidos hasta 1:1024.

## Immunofluorescencia Indirecta (IFI)

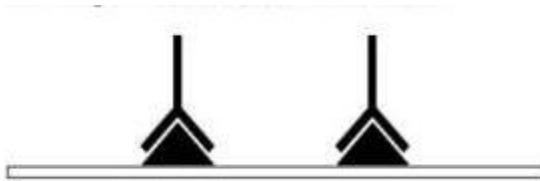
Ensayos de IFI indirecta es realizado en dos etapas, primero se realizo la fijación del antígeno usando células Vero infectadas, con *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. parkeri*, *R. rickettsii* estas laminillas fueron provista por el laboratorio de investigación de enfermedades rickettsiales y ehrlichiales de UTMB, la segunda etapa consistió en realizar el “sándwich” siguiendo el protocolo del Departamento de Patología de UTMB. (Olano 2001)(Figura 6) primero el anticuerpo primario (suero de pacientes) es colocado (10µl) en cada pozillo a una dilución 1:64, se expuso al antígeno por 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C y después se utilizo un anticuerpo secundario IgG de anti-

humano marcado con fluoresceína isothiocianato (diluido 1:300) (Kirkegaard & Perry Laboratories). Las laminillas fueron montadas con una cubierta adherida usando Cristal Mount (Biomedica, Foster City, CA) y observadas en un microscopio de fluorescencia, Olympus BX31 a una amplificación de 200X, las muestras positivas se utilizaron para determinar su dilución final hasta un límite de 1:1024.

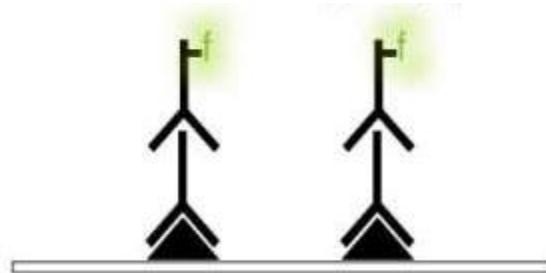
Paso 1: Antígeno microbiano es secado en una laminilla de vidrio y tratado con un fijador químico.



Paso 2: Diluciones del suero de pacientes son incubadas con el antígeno en la laminilla y después lavado.



Paso 3: Se agrega un anticuerpo marcado con fluoresceína (conjugado).



**Figura 6. Ilustración de inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

## **Colecta de garrapatas**

La colección de garrapatas fue realizada en 3 diferentes ocasiones 2004, 2005 y 2007 en municipios del sur del estado de Nuevo León con evidencia de seroprevalencia de rickettsiosis. Se usando el dragado en vegetación, mediante el uso de trampas de hielo seco (CO<sub>2</sub>) o directamente extraídas de ganado bovino, equinos de la región, y de perros en cada ocasión se colectaron aproximadamente entre 300 a 900 garrapatas de cada municipio (Linares y Allende). Las garrapatas fueron mantenidas vivas y las muertas en hielo seco, de esta manera fueron transportadas hasta el laboratorio de investigación de enfermedades rickettsiales y ehrlichiales, en Galveston, Texas, EU. Todos los procedimientos de aislamiento y extracción de ácidos nucleicos fueron realizados en el laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL3).

## **Identificación de Garrapatas**

La identificación de las garrapatas fue realizada mediante la observación de los especímenes bajo el estereoscopio basándose en el uso de llaves de identificación taxonómica, revisión de bibliografía y confirmada con por el Dr. Pete Teel, experto en acarología de la Texas A&M University, College Station, EU.(Kohls 1958)(Keirans & Durden 1998)

## **Aislamiento de Rickettsia.**

El aislamiento de la rickettsiae fue obtenido a partir de garrapatas *A. imitator* colectadas en los sitios mencionados anteriormente o de huevecillos de *A. imitator* mantenidos en laboratorio después de alimentarlas en conejo. La técnica usada fue la del uso de cultivo celular en viales tipo *shell* inoculado y centrifugado para forzar el contacto con las células (Kelly et al., 1991). Las garrapatas fueron esterilizadas en una solución de cloro al 3% y con alcohol etílico al 70%, se realizaron lavados con solución salina amortiguada con fosfato (PBS: 137 mM cloruro de sodio, 2 a 7 mM cloruro de potasio, 4 a 3 mM fosfato de sodio dibásico, 1 a 4 mM fosfato de potasio) entre cada lavado, y fueron trituradas en 200 µL de DMEM con 10% de suero de becerro bovino (SBB), el triturado fue utilizado para inocular la monocapa de células Vero. Los viales tipo *shell* fueron incubados a 34°C y monitoreados diariamente mediante una tinción *Diff-Quick* para verificar la presencia de rickettsiae, laminillas en las que se observaron al menos cuatro rickettsiae fueron consideradas positivas y la monocapa del vial correspondiente fue retirada manualmente para inocular la monocapa de células Vero de un frasco de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo DMEM con 3% SBB para la propagación de la bacteria. Las células infectadas en el frasco de 25 cm<sup>2</sup> fueron monitoreadas diariamente usando la tinción *Dif-Quick*, hasta que se observo una infección del 90% de las células, estas fueron cosechadas y usadas para inocular la monocapa de células Vero en frascos de 150 cm<sup>2</sup>. Los aislados de las garrapatas *A. imitator* fueron luego caracterizados por técnicas

moleculares que se describen más adelante y analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

## **Western blot**

### **Preparación de antígeno en membrana de nylon.**

Se usó un gel en gradiente Nupage® de Invitrogen® de acuerdo a las indicaciones del manual, previamente el antígeno se mezcló con el Nupage® LDS Sample Buffer 4X, el gel se corrió a 180 volts por 45 minutos, se usó un marcador de peso molecular en el primer carril, enseguida el gel fue transferido a una membrana de nylon con carga positiva usando una plancha de transferencia de 15 volts por 30 minutos, posteriormente la membrana con el antígeno es bloqueado con 3% leche en TBS por toda la noche. Después se procedió a lavar con TBS con 0.1% de Tween 20, esta membrana posteriormente se usó en el western blot.

### **Western Immunoblot**

Las membranas de nitrocelulosa con el antígeno fueron bloqueadas en solución amortiguadora-Tris salina (TBS [pH 8.0]) con 3% leche libre de grasa por una hora. Después se procedió a lavarlas con TBS con 0.1% de Tween 20, estas membranas posteriormente fueron colocadas en una prensa multicanal (Multiscreen; Bio-Rad). El suero de los pacientes con sospecha de haber tenido rickettsiosis (Anticuerpo primario) es diluido (1:100) en solución amortiguadora de bloqueo, y 450µl fueron transferidos en cada canal sobre la membrana de nitrocelulosa con el antígeno, por una hora a temperatura ambiente con agitación lenta. Las membranas fueron después lavadas con solución tampón de lavado (TBS-0.05% con Tween 20), enseguida se agregó el segundo anticuerpo con marcador de fosfatasa alcalina conjugada anti-humano IgG diluido en solución de bloqueo (1:5000) por una hora. Después las membranas fueron lavadas y incubadas en 5-bromo-4-cloro-3 indolil-fosfato y tetrazilium nitroblue (NBT/BCIP; Roche®) para visualizar los anticuerpos acoplados a la membrana.

### **Extracción de ADN de garrapatas**

Se compararon diferentes metodologías para determinar cual era la mejor opción en cuanto a practicidad y calidad del ADN extraído. Entre los métodos comparados estuvieron la extracción por fenol cloroformo, la de calentamiento en solución de hidróxido de amonio y usando el kit Dnaeasy® de Qiagen®. Se realizaron 16 repeticiones usando 16 diferentes garrapatas adultas.

Considerando la practicidad principalmente y que la cantidad y pureza del uso del paquete comercial Dnaeasy® de Qiagen®, es suficiente para realizar una detección aceptable de material genético de rickettsia por PCR y por ello se decidió realizar las siguientes extracciones usando este kit comercial.

Los resultados de este comparativo mostraron que la técnica por calentamiento en solución de hidróxido de amonio fue la que menos cantidad de ADN se obtuvo con un promedio de 25ng/μl y una pureza de 1.14 en absorbancia 260/280, la que le siguió fue usando el Dnaeasy® de Qiagen® con un promedio de 32ng/μl y una pureza de 1.4 a 260/280, y la que mejor resultado dio fue la técnica por fenol cloroformo con una cantidad de 40.2ng/μl y una pureza de 1.56 en absorbancia 260/280.

### **Aislamiento de rickettsia en garrapatas.**

La metodología para el aislamiento de garrapatas fue considerada tomando en cuenta publicaciones previas de aislamiento de rickettsia a partir de garrapatas (Kelly, *et al.*, 1991). Las garrapatas vivas fueron primero desinfectadas y sometidas primero que a una prueba de hemolinfa, cortando una pata bajo condiciones estériles y colocando una gota de hemolinfa en un portaobjeto, enseguida se realizó una tinción de Giménez. (Gimenez 1964)

### **Técnica de PCR para determinar la presencia de DNA rickettsial en garrapatas.**

La metodología para determinar la presencia de rickettsias en garrapatas, es mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su acrónimo en inglés) la cual amplifica cualquier material genómico de rickettsia mediante el uso de iniciadores específicos. (Tabla 3)

Aproximadamente 5 microlitros (60ng) del ADN extraído fueron usados como molde para la amplificación de fragmentos del gen de la proteína 17-kDa. Una porción de 434 pares de bases (pb) del gen 17 kDa fue flanqueado usando los primers previamente descritos para cada pool de ADN de cinco garrapatas. (Webb et al. 1990)

Las condiciones de PCR para estos primers son las siguientes. 3 minutos en etapa de desnaturalización, 94°C seguido por 40 ciclos de desnaturalización, a 94 °C por 1 min. Alineamiento de 48°C por 1 min., y una extensión a 72 °C por 2 min., la amplificación es completada con una elongación de la mezcla a 72°C por 7 min para completar la reacción de PCR.

Se usaron diez microlitros de producto de PCR para la separación por electroforesis en un gel de 1.5% de agarosa; para su examinación el gel fue teñido con bromuro de etidio y examinado en un trans-iluminador de luz ultravioleta. PCR anidado fue necesario en todas las muestras que resultaron negativas usando primers 17kDn1, 17kDn2, 17kDn3, 17kD5. La amplificación del PCR fue realizada en 50 μl, conteniendo 25μl de

Hotmaster mix (Eppendorf), 1µl de cada primer y agua de grado molecular para completar la reacción. El control positivo que se usó fue ADN de *Rickettsia conorii* y agua grado molecular como control negativo fue incluido en cada ensayo. (Tabla 1)

Los genes utilizados para el análisis filogenético fueron *gltA* (citrato sintasa), *ompA* y *ompB* (proteína de la membrana externa) (Tabla 3). Estos son los tres genes más importantes para la taxonomía molecular de rickettsia. (Labruna et al. 2004; Bouyer et al. 2001; Roux et al. 1997)

### **Caracterización molecular de *Rickettsias* aisladas**

Los genes amplificados para el análisis filogenético fueron *gltA* (citrato sintasa) *ompA* y *ompB*, (proteína de la membrana externa). Las condiciones de amplificación fueron realizadas como se describe en la publicación del Dr. Bouyer en 2001 indica que estos tres genes son los flancos más importantes en la taxonomía molecular de rickettsiae.

Los productos de PCR del tamaño esperado fueron clonados usando el paquete comercial TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Los plásmidos con el inserto de ADN del tamaño adecuado, fueron secuenciados al menos 3 veces usando un secuenciador automatizado ABI con oligonucleótidos iniciadores sentido M13: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' y anti-sentido M13: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Invitrogen, Carlsbad CA).

Las secuencias obtenidas se verificaron usando un software de análisis de secuencias genéticas, Lasergene ® Seqman pro™ (DNASTAR 7.1.0)

### **Microscopia Electrónica de Transmisión**

Frascos tamaño T75 con monocapa de células Vero infectadas fueron raspadas y fijadas en fijador Ito, y post fijadas en tetroxido de osmio por 1 hora, y teñida *en bloc* en 1% acetato de uranilo 0.1 M, *buffer* de maleato (pH 5.2) descrito previamente. (Ito, S., 1981). El *pellet* fue deshidratado en etanol y sumergido en resina epóxica (Poly/Bed 812), y polimerizado a 60°C durante toda la noche. Secciones ultra-delgadas (70nm de espesor) fueron preparadas usando un ultra-micrótopo (Reichert Ultracut S)

**Tabla 3. Listado de primers usados para la identificación y caracterización genética de rickettsias.**

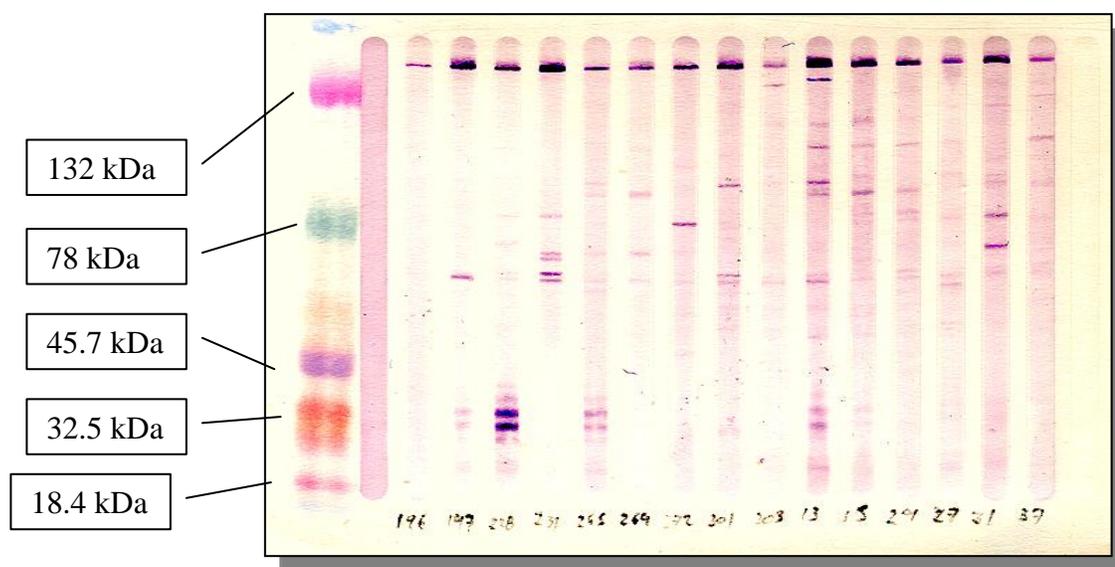
GEN	INICIADOR	ORIGEN	SECUENCIA DE LOS PRIMERS (5'→3')	TAMAÑO	REFERENCIA
17 kd protein	17kd1	<i>R. rickettsii</i>	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	434 bp	(Webb et al. 1990)
	17kd2		CATTGTTCGTCAGGTTGGCG		
	17kdn1	<i>R. typhi</i>	CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT	232 bp	(Medina-Sanchez et al. 2005)
	17kdn2		GTTTTATTAGTGGTTACGTAA		
	17kd3	<i>R. rickettsii</i>	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC	550 bp	(Labruna et al. 2004)
17kd5		GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA			
gltA	CS-78	<i>R. rickettsii</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 bp	(Labruna et al. 2004)
	CS-323		GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
	CS-239	<i>R. rickettsii</i>	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	836 bp	(Labruna et al. 2004)
	CS-1069		CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
	CS-5	<i>R. rickettsii</i>	GAGAGAAATTATATCCAAATGTTGAT	219 bp	(Labruna et al. 2004)
	CS-JA		TCGTCACTTTCTTTCTACAATACTT		
OmpA	Rr.190.70p	<i>R. rickettsii</i>	ATGGCGAATATTCTCCAAAA	532 bp	(R. L. Regnery et al. 1991)
	Rr190.602n		AGTGCAGCATTGCTCCCCCT		
	OmpA Fw1	<i>R. conorii</i>	CGCAGCGATAATGCTGAGTA	480 bp	(Medina-Sanchez et al. 2005)
	OmpA Rev2		GTTATCTTTGCCGGGGCTAC		
OmpB	OmpB 330 fw	<i>R. prowazekii</i>	ATGGCTCAAAAACCAATTTTCTAA	1110 bp	(Medina-Sanchez et al. 2005)
	OmpB 330 rev		AGCTCTACCTGCTCCATTATCTGTACC		

## RESULTADOS

### Resultados de estudio en sur de Nuevo León

#### Estudio de seroprevalencia en tres municipios del estado de Nuevo León,

Durante los años 2002-2004 se analizaron mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (**Figura 6**), un total de 349 muestras de suero de pacientes con signos y síntomas de una enfermedad febril y que previamente habían sido diagnosticadas como dengue negativas, de las cuales en 143 muestras se identifico presencia de algún anticuerpo rickettsial, (**Anexo 1**) al realizar los ensayos de inmuno-western blot usando como antígeno de rickettsias del grupo de tifo y grupo de las fiebres manchadas para determinar el tipo de rickettsiosis presente en esas regiones, se logro identificar que 85 muestras (25.1%) reaccionaron de manera positiva ante un antígeno del grupo tifo y 56 muestras (16%) reacciono a un antígeno de una rickettsia del grupo de las fiebres manchadas. (**Figura 7**)



**Figura 7. Revelado de western blot.** Se uso como referencia un marcador de peso molecular Kaleidoscope™ de Biorad. Donde muestra las bandas correspondiente a la proteína *ompB* cuyo peso molecular es de 135 kDa, y de LPS a los 37 kDa, Heat shock protein 60kDa.

Estas muestras fueron colectadas por el personal de secretaria de salud del estado de Nuevo León en las distintas unidades de servicios de salud de los municipios de Linares, Montemorelos y de Allende, enviadas al laboratorio estatal de salud pública de Nuevo León y posteriormente al laboratorio de investigaciones de enfermedades rickettsiales y

ehrliquiales del departamento de Patología en la University of Texas Medical Branch, en Galveston, Texas.

### **Colección e identificación de garrapatas**

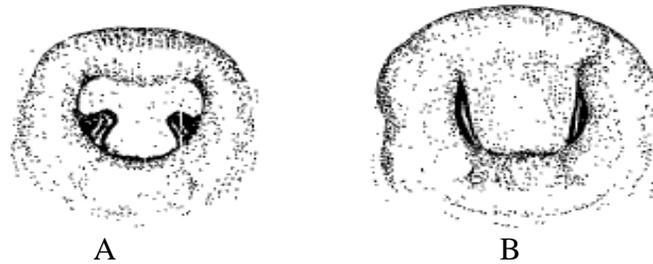
En Junio del 2004 se realizo la primera colecta de garrapatas en los municipios de Allende y Linares del estado de Nuevo León, estas zonas se eligieron basándose en los resultados de las inmunofluorescencias. Aproximadamente se colectaron 550 ejemplares en su mayoría capturados usando la técnica del dragado en suelo y vegetación. (**Figura 8 y 9**) La identificación de las garrapatas colectadas fue inicialmente confundida con *Amblyomma cajennense* como la más prevaleciente en la zona. Sin embargo al mandar a verificar las garrapatas de esta zona el Dr. Pete Teel de la Universidad de Texas A&M nos indico que se trataba de *A. imitator*. Al consultar una publicación de Kohls de 1958 en la que indica el gran parecido entre *A. cajennense* y *A. imitator*, cuya diferencia principal se encuentra en la apertura genital de la hembra al presentar proyecciones largas y angostas en ambos lados, diferencia de *A. cajennense* que las tiene más planas y adyacentes e intergumentales como lo muestra la figura. (**Figura 9**) (Kohls 1958).



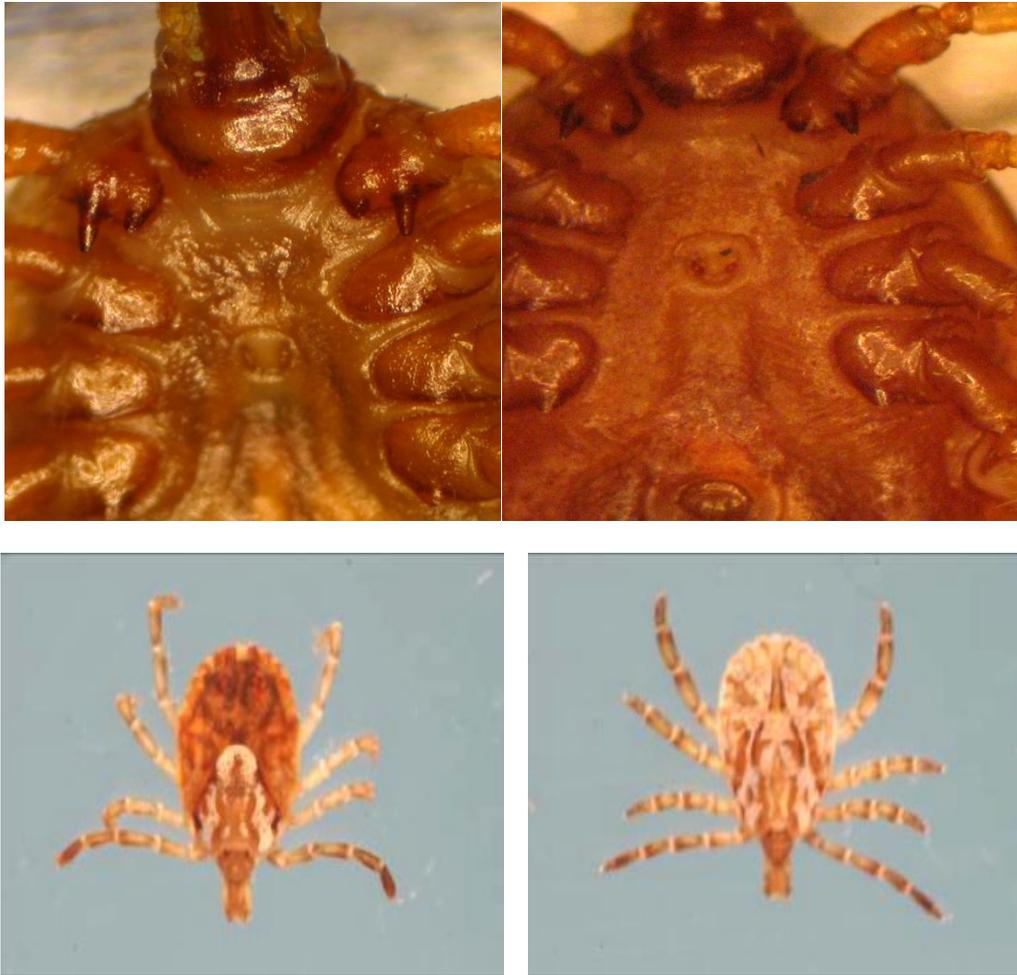
**Figura 8. Dragado en vegetación para colección de garrapatas en el municipio de Allende, NL.**



**Figura 9. Zona característica para colección de garrapatas en el municipio de Linares.** Se utilizaron mantas de lona color blanca para su arrastrar y capturar al artrópodo potencial vector de rickettsiosis.



**Figura 10. Área genital de *Amblyomma imitator* hembra (A) y *A. cajennense* (B).**

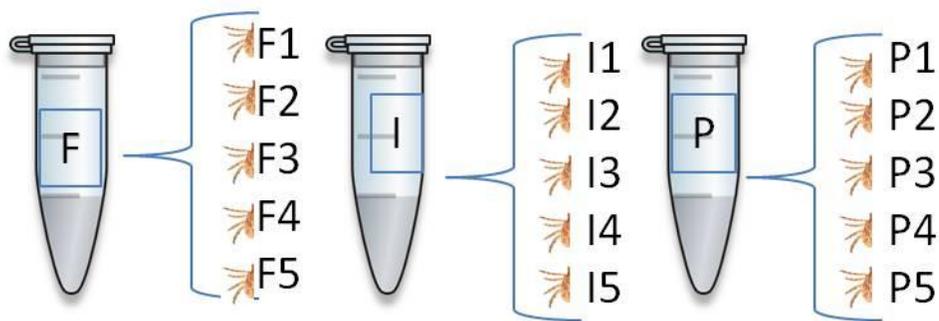


**Figura 11. *Amblyomma imitator*, colectada en el municipio de Linares Nuevo León. Hembra izquierda y macho derecha.**

### Resultado de la identificación de rickettsiae por PCR en garrapatas colectadas del municipio de linares en Junio 2004 (Primera Colecta)

Se utilizaron 200 garrapatas en total, estas fueron divididas en 40 pools de 5 mitades cada uno, a cada pool se le asigno una letra (Figura 12) El DNA genómico extraído de estos pools sirvió para amplificar los fragmentos genómicos utilizando primers de 17 kDa para realizar un tamiz del total de especímenes a estudiar. De los 38 pools 19 pools fueron positivo es decir mostraron presencia de material genético rickettsial un porcentaje alto. (

Figura 13)



**Figura 12. Diagrama de agrupamiento de garrapatas colectadas en el municipio de Linares, N.L. para su análisis por PCR y su posterior aislamiento.**



**Figura 13. Fotografía de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando uno de los resultados de PCR anidado usando los primers 17kDa. Usado como tamiz para posteriormente realizar un intento de aislamiento en cultivo celular y caracterización de los positivos.**

Las bandas de los pools positivos o que amplificaron el gen 17kDa anidado, se procedió a clonar en un plásmido pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> como vector de la marca invitrogen, con el fin de poder secuenciar estos fragmentos sin embargo las secuencias no fueron de buena calidad y fueron desechadas.

Por lo tanto se procedió a utilizar la segunda mitad almacenada a -80°C de las muestras que mostraron mayor intensidad en las bandas de amplificación para intentar realizar un aislamiento y poder reproducir las poblaciones de rickettsias y así obtener mayor cantidad de ADN y facilitar la secuenciación de la misma.

### **Resultados de intentos de Aislamiento en cultivo celular.**

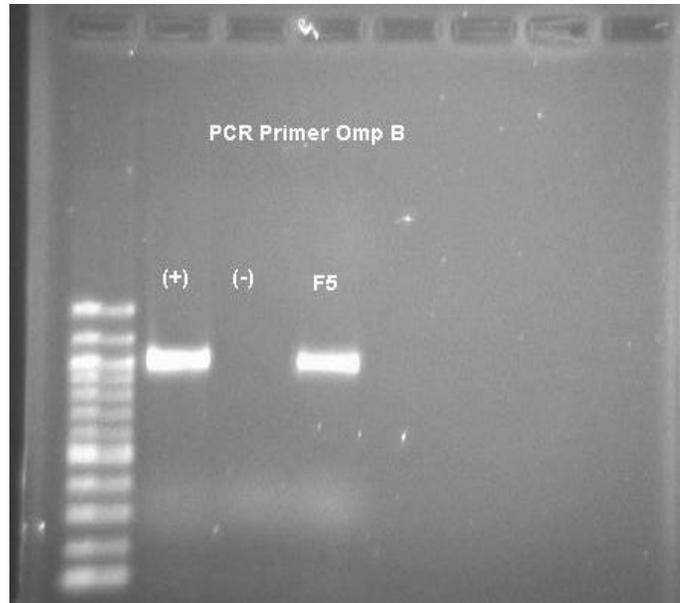
Los pools F, I y P fueron seleccionados para realizar intentos de aislamientos en células Vero. por la técnica de shell vial (Kelly et al. 1991), de manera individual (cada garrapata). Los viales fueron incubados a 32°C y monitoreados realizando raspados, colocando en un portaobjetos y se realizaron tinciones Dif Quik (**Figura 29**) cada día para verificar el estado de las células y descartando los cultivos contaminados después de incubarse a 32°C al día 21 después de la infección se identificaron 3 positivos de 15 viales inoculados, de los cuales solo uno estaba libre de contaminación. Para el día 24 se observaron 4 positivos al día 27 se seleccionaron solo 5 para transferir a un frasco de tamaño T25 las muestras **F5, I2, I4, P4 P5**.

Para el día 33 se lograron establecer los 5 cultivos celulares de células Vero en frascos de T150, para las muestras. I2, I4, F5, P4 y P5. Desafortunadamente el cultivo **F5** se contaminó y no se logró diseminar en mayor cantidad solo se llegó a mantener en un frasco de T150 (150cm<sup>2</sup>) y se logró rescatar el material ADN de este cultivo al igual que la muestra **I4** Sin embargo el ADN de esta muestra fue lo suficiente bueno para realizar una caracterización genética.

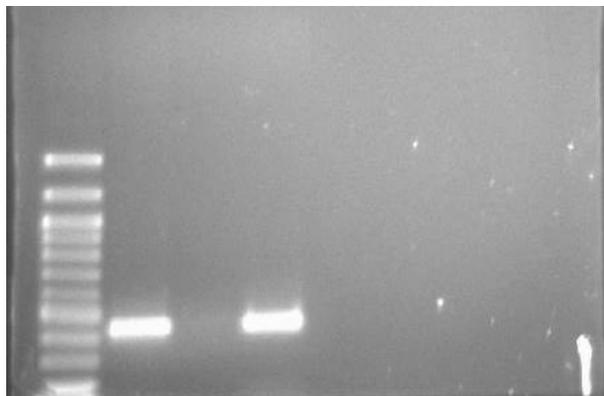
(**Figura 17-20**)

### **Caracterización Genética**

Los fragmentos de genes que se amplificaron fueron *gltA* y *ompB*. (**Fotografía 14**) Los intentos de amplificación del fragmento de 480 pb del gen *ompA* fueron negativos. Esto es un indicio de que se trataba de una rickettsia del grupo tifo, ya que este grupo de rickettsia no cuenta con este gen (*ompA*). (**Fotografía 16**)



**Figura 14. Fotografía de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, mostrando el resultado de un PCR para amplificar un fragmento de *ompB* (1110 pb). Utilizando DNA de la rickettsia aislada en el municipio de Linares, Nuevo León.**



**Figura 15. Fotografía de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de PCR 17kDa confirmatorio. (Banda de 434 pb).**



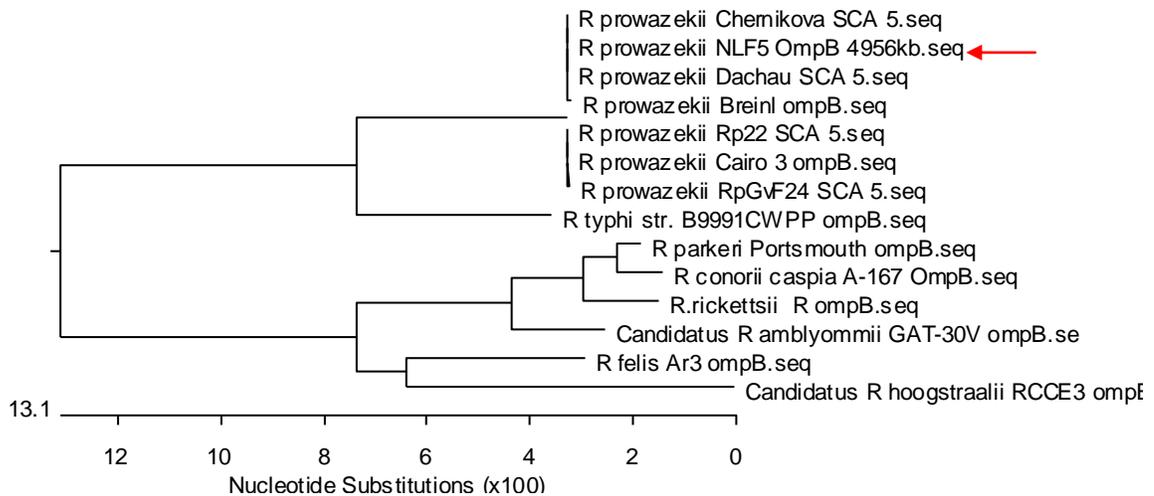
**Figura 16. Fotografía de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mostrando resultado negativo al tratar de amplificar un fragmento de el gen *ompA*. Donde F5 es uno de los aislados obtenidos a partir de garrapatas del municipio de Linares.**

### **Análisis de Secuenciación de genes amplificados.**

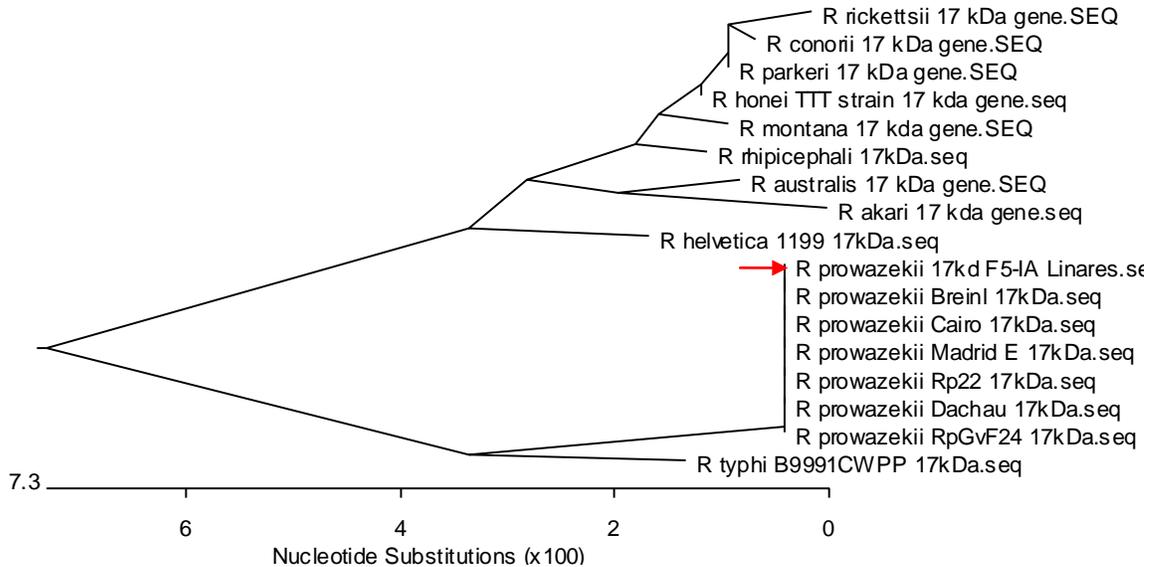
Los porcentajes de identidad presentan un 100% de similitud a las cepas de *R. prowazekii* Dachau, rp22, Chernikova, rpGvF24. (Figura 17)

		Percent Identity															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Divergence	1	■	99.9	100.0	100.0	99.9	100.0	100.0	82.5	80.3	92.5	82.2	81.4	81.7	81.3	1	R prowazekii Dachau SCA 5.seq
	2	0.1	■	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	82.4	80.3	92.5	82.2	81.4	81.6	81.2	2	R prowazekii Breinl ompB.seq
	3	0.0	0.1	■	100.0	100.0	100.0	100.0	82.5	80.3	92.5	82.2	81.4	81.7	81.3	3	R prowazekii Rp22 SCA 5.seq
	4	0.0	0.1	0.0	■	99.9	100.0	100.0	82.5	80.3	92.5	82.2	81.4	81.7	81.3	4	R prowazekii Chernikova SCA 5.seq
	5	0.1	0.2	0.0	0.1	■	100.0	99.9	82.5	80.3	92.5	82.2	81.4	81.6	81.2	5	R prowazekii RpGvF24 SCA 5.seq
	6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	■	100.0	82.5	80.3	92.5	82.2	81.4	81.6	81.3	6	R prowazekii Cairo 3 ompB.seq
	7	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	■	82.5	80.3	92.5	82.2	81.4	81.7	81.3	7	R prowazekii NLF5 OmpB 4956kb.seq ←
	8	20.2	20.2	20.1	20.2	20.2	20.2	20.2	■	90.8	82.8	91.5	90.3	90.7	90.6	8	R felis Ar3 ompB.seq
	9	23.0	23.1	23.0	23.0	23.1	23.0	23.0	9.9	■	80.6	88.6	87.9	88.2	88.1	9	Candidatus R hoogstraalii RCCE3 ompB.seq
	10	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	8.0	19.8	22.7	■	82.3	81.8	82.0	81.7	10	R typhi str. B9991CWPP ompB.seq
	11	20.4	20.5	20.4	20.4	20.5	20.5	20.4	9.1	12.5	20.4	■	95.6	95.6	95.5	11	Candidatus R amblyommii GAT-30V ompB.seq
	12	21.5	21.6	21.5	21.5	21.6	21.6	21.5	10.5	13.3	21.0	4.6	■	97.3	97.2	12	R.rickettsii R ompB.seq
	13	21.2	21.3	21.2	21.2	21.3	21.3	21.2	10.0	12.9	20.8	4.5	2.7	■	98.6	13	R parkeri Portsmouth ompB.seq
	14	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	10.1	13.1	21.2	4.7	2.9	1.4	■	14	R conorii caspia A-167 OmpB.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			

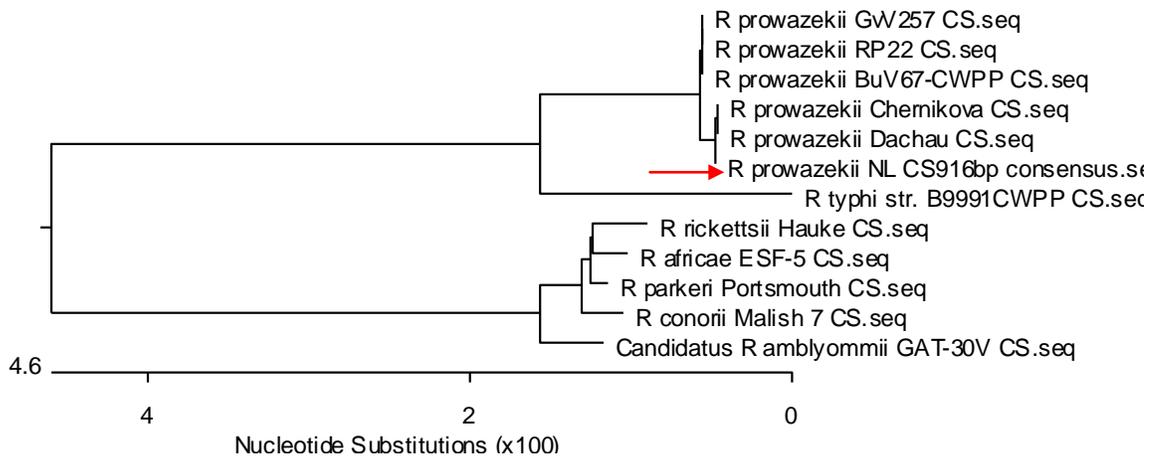
**Figura 17. Porcentaje de identidad y porcentaje de divergencia, al analizar las secuencias del gen *ompB*. Rickettsia aislada obtenida en el municipio de Linares Nuevo León (NLF5). Análisis realizado con Lasergene Core Suite de DNASTAR. Inc.**



**Figura 18. Árbol filogenético de *R. prowazekii* aislado en Linares, del gen *ompB* o *sca 5*. Se compararon con cepas del Genebank® del NIH (Instituto Nacional de Salud por sus siglas en inglés). Árbol filogenético realizado usando Lasergene Core Suite de DNASTAR. Inc.**



**Figura 19.Árbol filogenético de *R. prowazekii* aislado en Linares, del gen 17kDa. Comparado con cepas de el Genebank® del NIH. Árbol filogenético realizado usando Lasergene Core Suite de DNASTAR. Inc.**



**Figura 20. Árbol filogenético de *R. prowazekii* aislado en Linares, del gen Citrato sintetasa o *gltA*.** Comparado con cepas de el Genebank® del NIH. Árbol filogenético realizado usando Lasergene Core Suite de DNASTAR. Inc.

### Repetición de Resultados

Posteriormente el DNA extraído de otras 105 nuevas garrapatas fue examinado usando el gen de la proteína 17Kda, para identificar las garrapatas positivas o con presencia de material genético rickettsial, con el fin de corroborar los hallazgos anteriores.

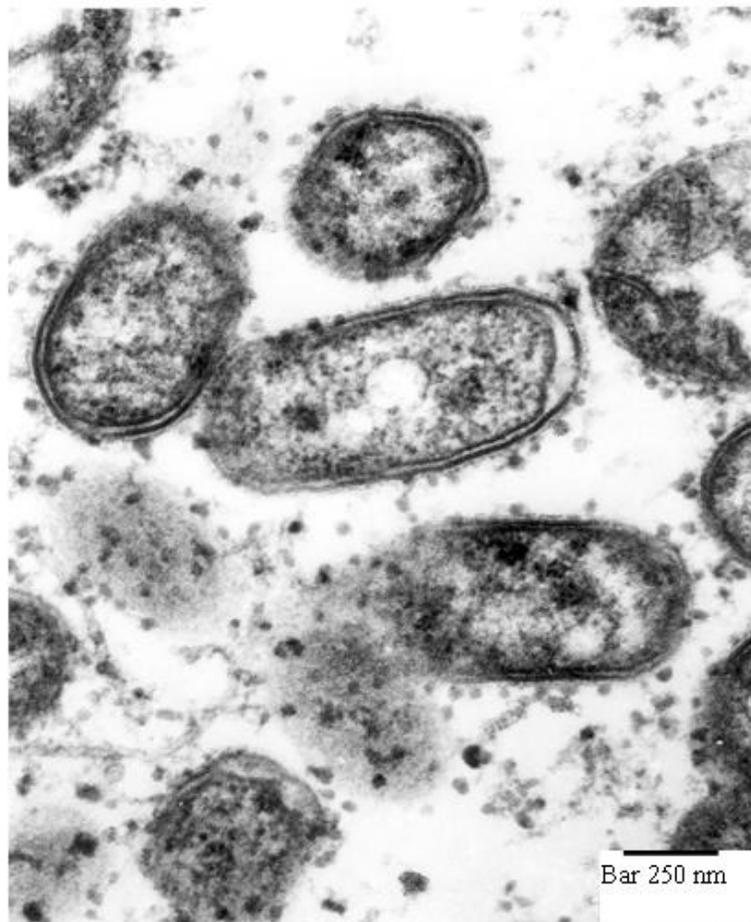
La garrapata #70 mostro una amplificación del gen, el gen parcial amplificado fue sometido a un análisis por BLAST para determinar similitudes con otras especies de *Rickettsias* y mostro 100% (434/434) de similitud con *R. prowazekii* gen 17kDa. (Resultado de Blast)

Estos resultados confirman la presencia de rickettsiosis en el estado de Nuevo León, específicamente *Rickettsia prowazekii* además que son los primeros estudios de identificación molecular en la entidad y las primeras secuencias genéticas analizadas.

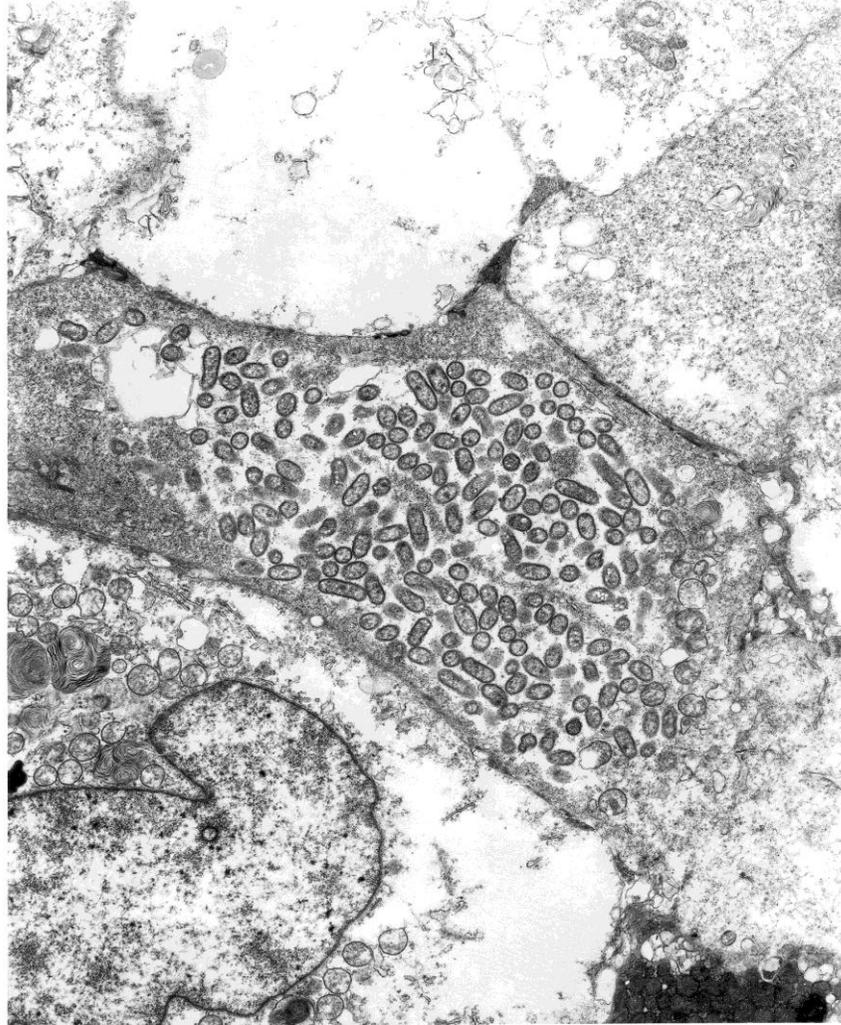
### **Resultado de análisis por Microscopia Electronica de Transmision (MET)**

La muestra de I4 fue seleccionada para realizar un análisis por microscopia electrónica de transmisión, analizado por el Dr. Vsevelod Popov y el Dr. Ted Whitworth. En el Laboratorio de Microscopia electrónica del departamento de patología de la *University of Texas Medical Branch*.

El análisis en el microscopio electrónico de transmisión muestra una bacteria de aproximadamente 1 $\mu$  (micrón), con una estructura dentro del citosol tipo vacuola, y basados en la literatura esto es una característica de las rickettsias del grupo tifo. También se (Figura 21).



**Figura 21. Microfotografía MET de una rickettsiae...**



**Figura 22. Microfotografía MET de un cumulo de rickettsias de aproximadamente 1 $\mu$  (micrón), infectando células del intestino de una garrapata *Amblyomma imitator*.**

## **Resultados Segunda Colecta en el municipio de Linares, N.L.**

Se realizo una segunda colecta a la zona previamente identificada con garrapatas positivas a *R. prowazekii*, con el objetivo de repetir los resultados encontrados en la primera colecta. Esto con el fin de despejar el escepticismo sobre el hallazgo de *R. prowazekii* en garrapata del genero *Amblyomma imitator* tomando en cuenta que el vector reportado en la literatura de esta especie de rickettsiae es el piojo (*Pediculus humanus corporis*).

Durante esta colecta se colectaron garrapatas de diferentes mamíferos, mediante el uso de trampas Sherman y capturando animales domésticos de las zona.(**Tabla 4**) Además se obtuvieron muestras de sangre de animales domésticos de la zona, para posibles intentos de aislamiento pero sin embargo no fue posible debido a la incapacidad de obtener una cadena fría hasta el laboratorio de UTMB.

Se capturaron 344 garrapatas directamente del pasto mediante el uso de dragado en vegetación y se identifico de nuevo a *Amblyomma imitator* como la especie más común en la zona, usando guías y llaves para su correcta identificación (Keirans & Durden 1998b; Kohls 1958). Y fueron mantenidas en el laboratorio por el método de Brossard y Wikel (Brossard & S K Wikel 2004). Estas colonias de garrapatas fueron mantenidas a 22°C, bajo un fotoperiodo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad. Las garrapatas fueron mantenidas en viales de vidrio de 16 ml (Wheaton Glass, Millville, NJ) cubiertas con una red en la parte superior y sobre una solución supersaturada de nitrato de potasio. Las larvas y ninfas se alimentaron de sangre de ratones y las garrapatas adultas se alimentaron en conejos libres de patógenos. Sin embargo solamente las colonias de *Amblyomma imitator* tuvieron éxito en establecerse en este laboratorio.

## **Resultados de Pruebas de hemolinfa**

Una vez contabilizadas las garrapatas se colocaron en una incubadora a 37°C por 3 días, para inducir el crecimiento acelerado de las rickettsias dentro de las garrapatas. Posteriormente se realizo la prueba de la hemolinfa y tinción de Giménez a cada una de ellas. De las cuales 78 se consideraron positivas pero este resultado se considera inespecífico.

**Tabla 4. Especies de garrapatas obtenidas de animales domésticos del municipio de Linares, NL.**

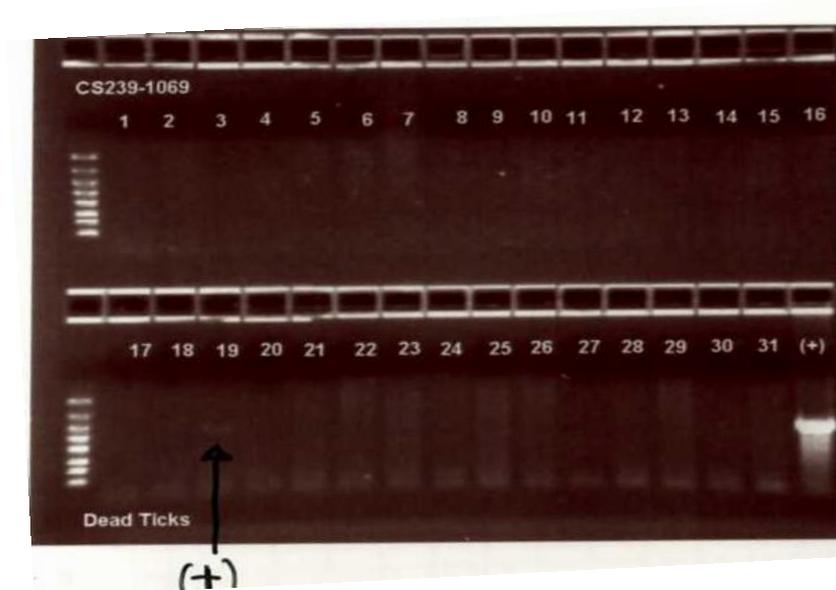
Hospedero	Especies colectadas
<i>C. lupus familiaris 1</i>	11 <i>Amblyomma imitator</i> 1 <i>Boophilus sp.</i>
<i>C. lupus familiaris 2</i>	27 <i>Amblyomma imitator</i>
<i>C. lupus familiaris 3</i>	17 <i>Amblyomma imitator</i>
<i>C. lupus familiaris 4</i>	14 <i>Amblyomma imitator</i>
<i>C. lupus familiaris 5</i>	3 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>C. lupus familiaris 6</i>	7 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>C. lupus familiaris 7</i>	6 <i>Amblyomma imitator</i>
<i>C. lupus familiaris 8</i>	4 <i>Dermacentor variabilis</i>
<i>Equus africanus asinus 1</i>	13 <i>Amblyomma imitator</i>
<i>Bos primigenius taurus 4</i>	14 <i>Amblyomma imitator</i> 2 <i>Boophilus sp.</i>

### Resultados de Analisis por PCR

De las 78 muestras positivas se procedió a realizar una extracción o aislamiento del DNA genómico para realizar una amplificación de genes rickettsiales y su respectiva secuenciación.

Después de probar 31 muestras por PCR se obtuvo la primer muestra positiva (**Figura 23**), se procedió a cortar la banda del gel de agarosa y a clonar en el vector Topo, con el fin de secuencias e identificar la especie de rickettsiae.

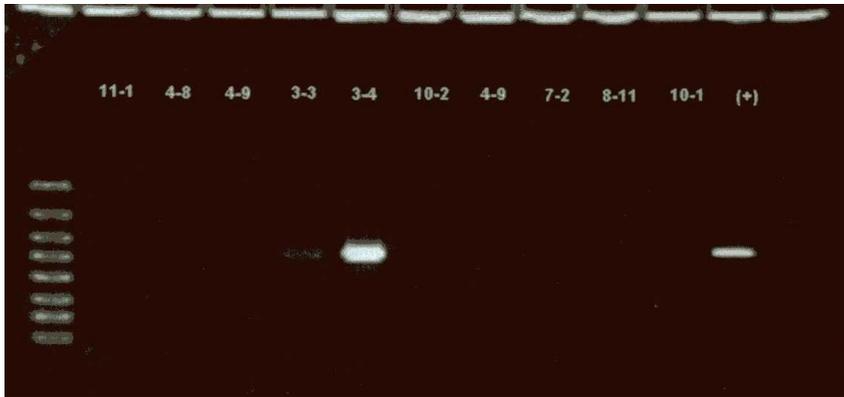
El resultado de esa secuenciación corroboró los resultados obtenidos anteriormente (2 años) es decir se identificó de nuevo a *Amblyomma imitator* como el posible vector de *Rickettsia prowazekii*.



**Figura 23.** Gel de Agarosa teñido con bromuro de etidio, amplificando un fragmento del gen citrato sintetasa (CS239-1069), mostrando a la muestra 19 positiva.

También se colectaron 4 hembras de *Dermacentor variabilis* totalmente repletas de un perro en un punto cercano del municipio de Linares, NL. De las cuales una vez colocadas en las cajas petri dentro de insectario de UTMB, se lograron obtener huevecillos de los cuales se hicieron extractos de ADN para comprobar si contenían rickettsias. Efectivamente se encontró que 2 de ellas amplificaron el fragmento del gen *gltA*. (Figura 24).

Estas bandas fueron cortadas, purificadas y clonadas para secuenciarse. Las secuencias que se obtuvieron fueron comparadas en la base de datos del Gene bank® del NCBI, arrojando como resultado a *Rickettsia belli* como la rickettsia presente en *Dermacentor variabilis*.

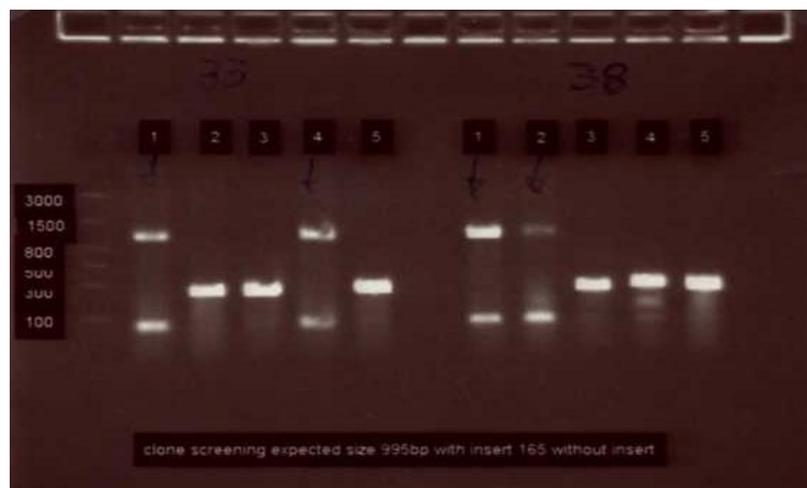


**Figura 24. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, evidenciando la amplificación de un fragmento del gen citrato sintetasa de dos muestras considerándose positivas a la presencia de material genético rickettsial.**

De las garrapatas colectadas en Linares, Nuevo Leon, Mexico 98 hembras y 48 machos *Amblyoma imitator* fueron alimentadas en conejo para establecer una colonia en el insectario de UTMB (Galveston, Texas, EU), de los cuales 7 machos resultaron positivos a la presencia de rickettsias sin embargo no fue posible obtener los datos de las secuencias.

También se colectaron pools de huevecillos de 61 garrapatas, *A. imitator* para realizar un aislamiento de ADN y amplificar material genético rickettsial por PCR.

Resultando 2 Garrapatas positivas al utilizar los primers CS239-1069, estas bandas fueron cortadas y purificadas, para posteriormente clonarlas y secuenciarlas. Al comparar los resultados del Analisis usando el Megablast® de NCBI. Se encontró un 99.99% de similitud a *Rickettsia prowazekii*.



**Figura 25. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, con resultados de dos pools de huevecillos positivos (33-38) clonados en un Vector pCR4-TOPO**

(Invitrogen), con el inserto de las muestras positivas. Clon 1 y 4 contienen inserto de la muestra 33 (izquierda y banda 1 y 2 contienen inserto de muestra 38. (Derecha).

### **Aislamiento de *Rickettsia rickettsii* en *Amblyomma imitator***

Trabajo realizado posterior a la estancia en UTMB y publicado en Emerg Infect Dis. 2010 August; 16(8): 1282–1284.(Oliveira et al. 2010)

A partir del establecimiento de colonias de *Amblyomma imitator* colectadas en el sur del estado de Nuevo León, Municipio de Linares. Se lograron obtener huevecillos de una generación completamente establecida en el laboratorio de los cuales se hicieron grupos y se realizaron aislamientos de ADN utilizando el kit Dneasy<sup>®</sup> (Qiagen, EU).

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real, usando primers específicos para rickettsiae, CS5A y CS6 para la amplificación de un fragmento de 150pb del gen citrato sintetasa. Los grupos de huevecillos positivos fueron luego macerados y colocados en un Shell vial para intentar realizar aislamiento de la rickettsia. Los viales positivos fueron luego transferidos a frascos de 150 cm<sup>2</sup> con células Vero para la propagación del agente.

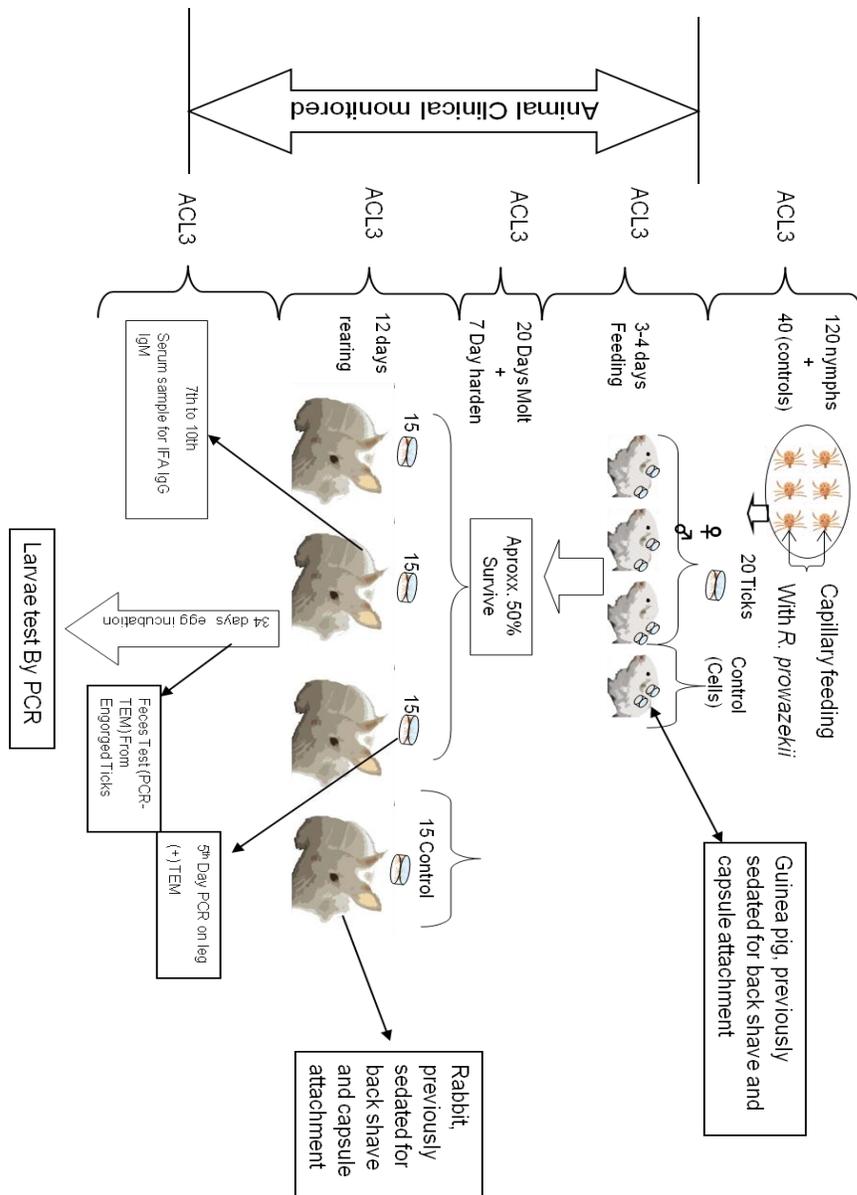
Para la caracterización se los aislados se utilizaron los genes de 17kDa, *ompB*, *ompA*, y *htrA*. Al realizar un análisis de las secuencias se encontró una similitud de 99% a *R. rickettsii* con solo un nucleótido de diferencia de 434, para la secuencia de *ompB* (856pb) y *ompA* (533pb), las secuencias mostraron un 100 % de similitud con la cepa de *R. rickettsii* Sheila Smith.

También se lograron obtener imágenes ultraestructurales de la rickettsia aislada por microscopía electrónica de transmisión sin embargo no fue posible encontrar rickettsias en las glándulas salivales o los ovarios. (Oliveira et al. 2010)

### **Transmisión transovarial de *Amblyomma imitator* con énfasis en *Rickettsia prowazekii***

Para poder considerar a la garrapata *Amblyomma imitator* con el vector de *Rickettsia prowazekii* en el sur del estado de nuevo león, fue necesario realizar un experimento para comprobar si es capaz de infectar a un conejillo de indias y a su prole.

El estudio se realizó en un insectario de bioseguridad nivel 3 por las características infecciosas *R. prowazekii*. Para lo cual se diseñó un protocolo único en las instalaciones del departamento de patología de UTMB.(Figura 26)



**Figura 26. Diseño experimental de pruebas de transmisión transovarial y capacidad de *A. imitator* de transmitir rickettsia**

### Resultados de pruebas de transmisión transovarial.

Se infectaron 120 garrapatas por alimentación por capilar de un sobrenadante de células infectadas con *R. prowazekii*, se procedió a continuar su alimentación en conejillos de india (*Cavia porcellus*, Hartley), de las cuales solo 29 lograron la repleción (24%).

Se realizó un monitoreo de la temperatura de los conejillos de indias cada día, y no se observó ningún cambio en la temperatura de los conejillos de indias, promediando 38°C. Por lo que no se pudo establecer las condiciones para infectar y observar manifestaciones clínicas de infección por *R. prowazekii* transmitido por *A. imitator*. Por lo tanto este experimento quedó inconcluso.

## DISCUSION

### **Aislamiento de *R. prowazekii* en *Amblyomma imitator***

A lo largo de la historia el piojo *Pediculus humanus corporis* ha sido el único insecto vector del tifo epidémico en México y el mundo. Sin embargo existen reportes de 1955, 1961 y 1966 de la presencia de *R. prowazekii* en garrapatas cuando la investigadoras Ruth Reiss Gutfreund describió el aislamiento de este agente etiológico en *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*, y *H. truncatum* en Etiopia, uno de esos aislados fue confirmado como *R. prowazekii* en el *Rocky Mountain Laboratory* nombrándolo como la cepa ZRS. (Reiss-Gutfreund 1955; Reiss-Gutfreund 1961; Reiss-Gutfreund 1966)

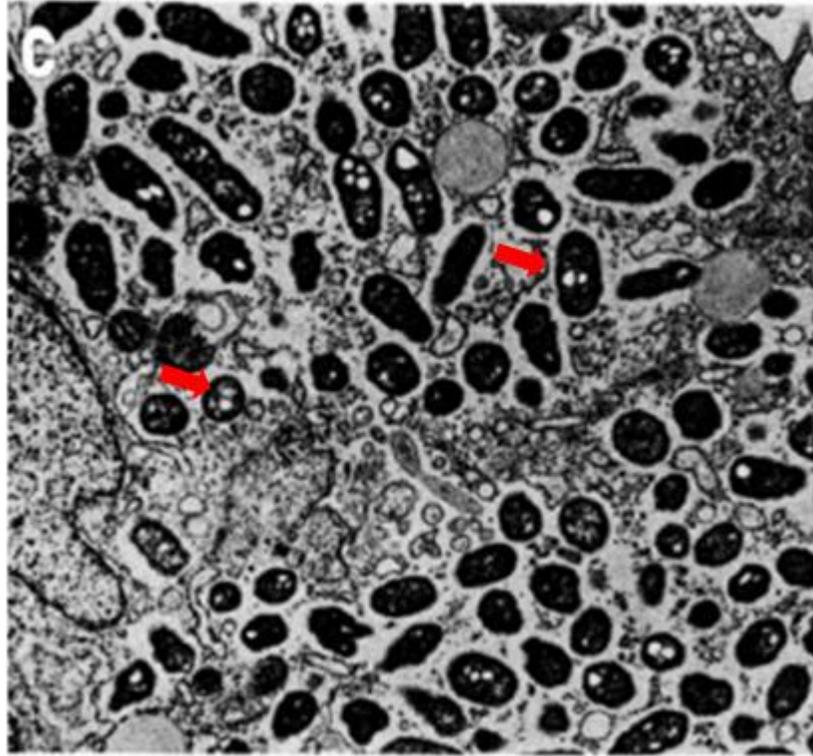
El Dr. Burgdorfer y Philip realizaron estudios posteriores en la misma región de Etiopia con el fin de confirmar el aislamiento de Reiss–Gutfreund. Mediante el uso de la prueba de hemolinfa con suero anti-*R. prowazekii* y se determinó que contenía una rickettsia del grupo tifus sin embargo no fue posible realizar su aislamiento. (Burgdorfer et al. 1973)

Existe un reporte de un paciente infectado con *R. prowazekii*, que presuntamente fue infectado en el sur de Texas, específicamente en la zona de la Isla del Padre, el paciente no describe ninguna picadura por garrapata, pero diez días después desarrollo un cuadro clínico que le provoco fiebre y dolor de cabeza que se complico durante casi 20 días en hospitales y diagnósticos hasta que se le practico una prueba para tifo positiva y tuvo mejora hasta que se le administro doxiciclina. Muestras de liquido cefaloraquideo fueron tomadas al dia 3 y 5 de la fase aguda, a las cuales se les extrajo ADN para realizar análisis por PCR. Con resultados positivos y secuencias idénticas a *R. prowazekii*. (Massung et al. 2001)

Este descubrimiento podría explicar la ocurrencia de *R: prowazekii* en este vacacionista en el sur de Texas, debido que esta área está considerada dentro de la zona donde se han de reportado *A. imitator*.(Kohls 1958). Además que *R. prowazekii* se ha asociado constantemente con la ardilla voladora en los estados unidos, y la ausencia de esta especie de ardilla en el sur de Texas, sugiere otra fuente de infección. Lo más probable que esté ocurriendo es la transmisión por la garrapata *Amblyomma* sp. (David H Walker et al. 2008)

La evidencia encontrada en este estudio demostró que efectivamente se logro aislar rickettsias del grupo tifo dentro de los órganos de una garrapata, la evidencia de el análisis ultra estructural por microscopia electrónica de transmisión muestra las estructuras en forma de vacuolas en el citosol de la rickettsia, estas estructuras son características de los organismos del grupo tifo en su fase estacionaria de crecimiento.

(Figura 27) (Yu, X.J., Walker 2005)



**Figura 27.** *R. prowazekii* libres en el citoplasma de fibroplastos de embriones de pollo infectados. Las flechas rojas muestran un ejemplo de las estructuras tipo vacuolas que aparecen cuando los nutrientes están bajos o agotados [X 13600]. (Yu, X.J., Walker 2005)

Se logró establecer al menos 2 cultivos celulares limpios realizando, e inclusive se llegó a purificar por la técnica de renografina (G. A. Dasch & Weiss 1977) y se envió a secuenciar el genoma completo a *Baylor College of Medicine* dentro del Laboratorio de *Human Genome Sequencing Center*, en Houston Texas, EU. Con la ayuda del Dr. Weinstock con el fin de caracterizar completamente la cepa de *R. prowazekii*, de Nuevo León, México y poder ver las diferencias y similitudes con las otras cepas de *R. prowazekii* y poder determinar el origen de esta especie o bien determinar cuál es el origen del vector si la *Amblyomma imitator* o si pasó a adaptarse al piojo *Pediculus humanus corporis*. Sin embargo este proyecto quedó inconcluso al no concretarse las anotaciones de toda el genoma.

Sin embargo los análisis filogenéticos realizados con los fragmentos amplificados en el laboratorio de enfermedades erlichiales y rickettsiales del departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas nos brindó suficiente evidencia para identificarla como una cepa filogenéticamente relacionada con la cepa Breinl.

### **Identificación de *R. belli* en *Dermacentor variabilis* obtenida en el sur del estado de Nuevo León**

En México no existe reporte alguno sobre la identificación de *R. belli*, sin embargo existen publicaciones que mencionan a *R. belli* como un agente común en América, sobre todo en garrapatas Ixodae como *Dermacentor sp.*, *Amblyomma sp* y *Hemaphysalis sp.*, aunque también hay reporte de haberla encontrado en Argasidae, (R. N. Philip & Casper 1981; Labruna et al. 2007; Labruna et al. 2005) además esta rickettsia se ha considerado dentro de un grupo de rickettsias ancestrales al igual que *R. canadensis*. (Diane R. Stothard & Fuerst 1995; Roux et al. 1997)

*R. belli* a pesar que no se considera un patógeno de alto riesgo para los humanos existe un gran parecido en la estructura de su genoma con bacterias amoeba (*L. pneumophila* y *P. amoebophila*).

**CAPITULO 2. BÚSQUEDA DE SEROPREVALENCIA E IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE RICKETTSIOSIS Y SUS ARTRÓPODOS VECTORES EN UN POBLADO RURAL DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO.**

## METODOLOGIA

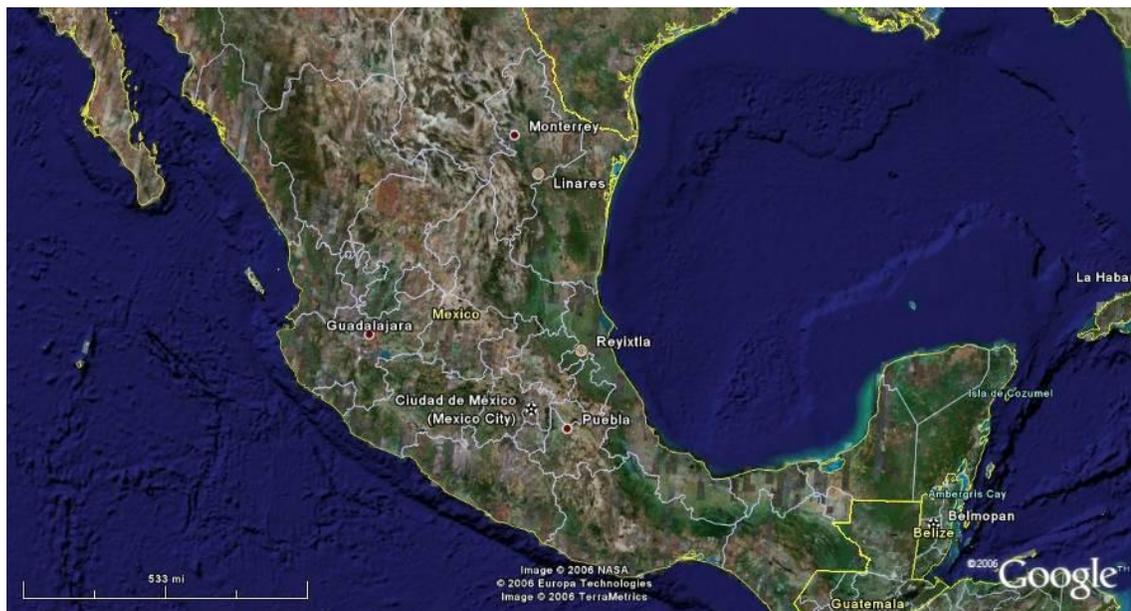
El estudio de Veracruz fue determinado por un estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas, en este estudio se colectaron suero de pacientes con posible infección por *Tripanosoma*, estos sueros también fueron usados para ensayos de IFI en busca de anticuerpos IgG anti-rickettsia, arrojando resultados inesperados de seroprevalencia a las rickettsiae del grupo de tifus y al grupo de las fiebres manchadas.

### Area de estudio

El area de estudio fue considerado de acuerdo a los antecedentes antes mencionado de sero-prevalencia de rickettsiosis.

Esta comunidad en su mayoría indígena, ubicada dentro del municipio de Ixhuatlán de Madero en el norte de Veracruz, cuyas características se muestran a continuación **(Figura 28-29)**:

- Localizado a una latitud de 20°52'41''N y longitud 98°031'24''W
- Temperatura: 28°C-33°C
- Humedad relativa: 58%
- Altura de 266 metros sobre el nivel del mar.
- El estudio de la población incluyo a 396 residentes de Reyixtla, Veracruz. Los cuales voluntariamente dieron su consentimiento para responder a una encuesta epidemiológica acerca de su historial médico, higiene personal y exposición a animales o artrópodos. **(Figura 30-31)**



**Figura 28. Ubicación de Reyixtla, Veracruz, poblado donde se realizo el estudi**

## **Colección de sueros**

Se realizó una colección de suero de los habitantes del Reyixtla, Veracruz, México, con la ayuda de personal de SSA del Estado de Veracruz y por Estudiantes de Medicina de UTMB. Se tomaron las muestras usando un procedimiento aseptico y colectando las muestras en Vacutainers® con coagulante para para separar el suero.

Las muestras fueron luego trasladadas a las instalaciones de UTMB para su posterior análisis. **(Figura 31)**



**Figura 29. . Características de las edificaciones de Reyixtla, Veracruz, México**

## **Colección de Artrópodos**

### **Piojos**

La búsqueda de piojos (*Pediculus humanus corporis*) se realizó mediante el consentimiento de las personas que acudieron voluntariamente a cooperar con el estudio en las cuales se les realizó una exploración de la vestimenta, focalizando la búsqueda entre las costuras de las prendas. **(Figura 30)**



**Figura 30. Búsqueda de artrópodos vectores en pliegues de costuras de las vestimentas de los pobladores de Reyixtla, en el estado de Veracruz, México**



**Figura 31. Recolección de información mediante un cuestionario y toma de muestras de sangre en los pobladores de Reyixtla, Veracruz, Mex.**

### **Garrapatas**

La colecta de garrapatas fue realizada mediante dragado de vegetación usando una manta de color blanco para facilitar la visualización de las garrapatas,(**Figura 32**)

extrayendo directamente de hospederos de la región, como caballos, ganado, perros o mediante el uso de trampas de CO<sub>2</sub> estas trampas fueron colocadas en zonas donde se identifico la presencia de garrapatas, y hubo inclusive un caso de una garrapata extraída de la espalda de una mujer (**Figura 33**), estas garrapatas fueron transportadas vivas hasta el insectario de bioseguridad nivel 3 del departamento de patología de UTMB en Galveston Texas.



**Figura 32. Dragado de vegetación utilizando una lona color blanca para la fácil detección de garrapatas**

## **Metodología de Aislamiento e identificación de Rickettsiae**

Después de haber sido identificadas las garrapatas colectadas en campo se procedió a realizar el diagnostico y los intentos de aislamiento de rickettsiae:

### **Lavado:**

Las garrapatas fueron colocadas en un matraz de filtración estéril colocando primero una solución al 70% de Alcohol etílico por 10 minutos. Se enjuagaron con PBS (137 mM cloruro de sodio, 2-7 mM cloruro de potasio, 4-3 mM fosfato de sodio di-básico, 1-4 mM fosfato de potasio)

Lavado con una solución al 3% de cloro por 10 minutos.

Enjuagado con PBS

Secado en papel absorbente estéril.

**Prueba de hemolinfa** (Burgdorfer 1970)

Las garrapatas previamente fueron colocadas 24 horas a 37°C para iniciar la multiplicación de rickettsiae en los hemocitos.

Se amputo la parte distal de una o más patas de la garrapata usando una tijera de disección.

La gota exudada de la herida se colocó tocando con una gota en cada pozo del portaobjeto. Cada garrapata fue colocada en uno de los 12 pozos de cada portaobjeto.

La preparación se dejó secar al aire y se fijó con calor.

Se tiñó por el método de Giménez (Gimenez 1964)

Se examinó con aceite de inmersión al microscopio.

### **Aislamiento en viales *Shell***

La técnica que se usó para el intento de aislamiento fue la del uso de cultivo celular en viales tipo *shell*. (Kelly et al. 1991)

Las garrapatas fueron trituradas en 200 µL de DMEM con 10% de suero de becerro bovino (SBB),

El triturado fue utilizado para inocular la mono-capa de células Vero.

Una vez inoculado el vial *shell* se procedió a centrifugar.

Los viales tipo *shell* fueron incubados a 34°C y monitoreados diariamente mediante una tinción *Diff-Quick* para verificar la presencia de rickettsiae.

Las laminillas en las que se observaron al menos cuatro rickettsiae fueron consideradas positivas.

La mono-capa del vial correspondiente fue retirada manualmente para inocular la mono-capa de células Vero de un frasco de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo DMEM con 3% SBB para la propagación de la bacteria.

Las células infectadas en el frasco de 25 cm<sup>2</sup> fueron monitoreadas diariamente usando la tinción *Dif-Quick*, hasta que se observó una infección del 90% de las células.

Las células infectadas fueron cosechadas y usadas para inocular la mono-capa de células Vero en frascos de 150 cm<sup>2</sup>.

### **Purificación**

La purificación de las rickettsiae aisladas fue realizada por centrifugación de gradientes de densidad isopícnica. (Ammerman et al. 2008) La purificación fue realizada bajo condiciones de bioseguridad nivel 3, en el departamento de patología de UTMB.

### **Microscopia Electrónica de Transmisión**

Se realizó un análisis ultraestructural de las rickettsias aisladas para determinar las características morfológicas del aislado

Se siguió el protocolo descrito anteriormente. (Página 40)

### **Western Blot**

Se realizó un análisis por western blot para determinar la especificidad de los anticuerpos obtenidos a partir de los sueros colectados en la población de Reyixtla, Veracruz.

Se utilizó el protocolo descrito anteriormente. (Página 36)

### **Identificación genética**

Se realizó la caracterización de las rickettsias aisladas, por amplificación de material genético y secuenciación de genes, para su posterior secuenciación en la base de datos del Gene bank.

Se siguió el procedimiento mencionado anteriormente. (Páginas 38-39)

# RESULTADOS

## Resultados de búsqueda de posibles artrópodos vectores de rickettsiosis.

Los resultados de la búsqueda de piojos en las vestimentas de las personas que asistieron a la toma de muestra sangre convocados por la unidad rural de SSA, indicaron que no existía la presencia de piojos (*Pediculus humanus corporis*) en las vestimentas, además que las encuestas realizadas a los pobladores de la comunidad de Reyixtla, indicaron que si habían sido expuestos a picadura de garrapata al menos una vez en el año.

Al realizar un muestreo en las periferias de las casas de Reyixtla y zonas donde comúnmente realizan actividades los pobladores de este pueblo, encontramos sitios infestados de garrapatas del genero *Amblyomma sp.* que posteriormente fueron identificadas en el laboratorio, como *Amblyomma cajennense* (**Figura 34**) en su mayoría y también algunos especímenes de *Amblyomma ovale*.(**Figura 35**).

También se presento el caso donde un habitante del género femenino de aproximadamente 40 años de edad, de complexión robusta de este pueblo, se presento al centro de salud a un chequeo médico, y al realizar una exploración física el médico encontró una garrapata adherida a la espalda de la paciente (**Figura 33**), esto corrobora los resultados de las encuestas en la población.

Al realizar colección de artrópodos en los animales domésticos de la población se lograron conservar 13 pulgas hasta el laboratorio de patología de UTMB, estas fueron identificadas como *Ctenocephalides canis*.



**Figura 33. Herida causada por mordedura de garrapata en espalda de habitante de la comunidad de Reyixtla..**



**Figura 34. Garrapata *Amblyomma cajennense* especie colectada en la periferia de Reyixtla, y la cual se encontró en mayor proporción.**



**Figura 35.** *Amblyomma ovale*, colectada en Reyixtla, Veracruz, México

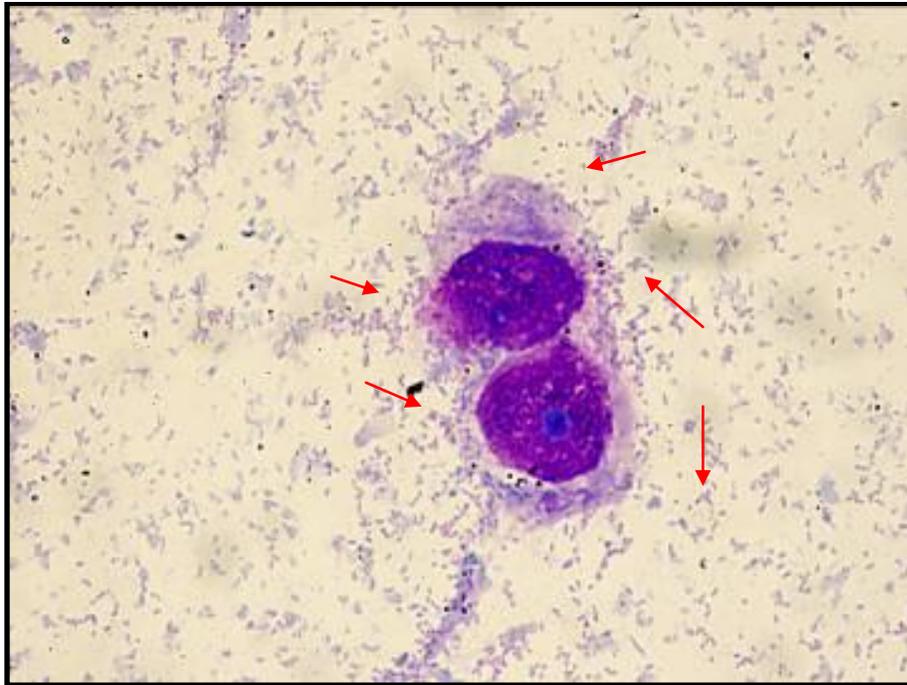
### **Resultados de Prueba de Hemolinfa**

Se realizó un *screening* de 64 garrapatas, las cuales se tiñeron con la técnica de Giménez, basándonos en la prueba de hemolinfa (Burgdorfer 1970) para la identificación de posibles garrapatas infectadas con rickettsia aun vivas, con la finalidad de lograr un aislamiento en caso de encontrar especímenes positivos y así reducir gastos por las pruebas de diagnóstico molecular y cultivo celular.

De las 64 pruebas, 20 salieron positivas (31%), estas posteriormente fueron procesadas para realizar el intento de aislamiento por el método de shell vial (Kelly et al. 1991)

### **Resultados de aislamientos en cultivo celular**

Se procesaron 20 garrapatas, diagnosticadas positivas por la prueba de hemolinfa, de las cuales 11, presentaron cultivos positivos en los shell vials, los cuales se confirmaron primeramente por una tinción Diff Quik y observados al microscopio. (**Figura 36**).



**Figura 36. Tinción Diff-Quik de rickettsias diseminadas en todo el citosol.** Vista desde el microscopio a 100X, al centro se puede observar el núcleo de las células Vero color violeta intenso y alrededor se observan cientos de rickettsiae (flechas).

Los viales positivos fueron mantenidos a 32°C por 7 días y al observar un aproximadamente un 80 por ciento de infección fueron transferidos a frascos T25, para su diseminación en más células y posteriormente ser utilizados como antígeno para realizar inmunofluorescencias y western immuno blots. Posteriormente se procedió a realizar el análisis genético por PCR y secuenciación a partir de DNA aislado de estos cultivos celulares.

## Resultados de Análisis de PCR y Secuenciación Genética

Se realizo la amplificación de fragmentos de los genes comúnmente usados para la identificación o caracterización de rickettsias en varios trabajos anteriores (Labruna et al. 2004; F Bacellar et al. 1995; R. L. Regnery et al. 1991)

Se utilizaron primers para amplificar fragmentos de los genes 17kDa, *gltA*, *ompA*, *ompB* para su genotipificación. De los cuales se secuenciaron los fragmentos de 17kDa, *gltA* y *ompA*.

El análisis de las secuencias se realizo en la página del centro nacional de información biotecnológica de estados unidos (National Center for Biotechnology Information) utilizando la aplicación Blast®(Basic Local Alignment Search Tool) obteniendo como resultados de este análisis, de 434 pb del gen 17kDa 99% de similitud a *Rickettsia amblyommii* , de 385pb del gen *gltA* 99% de similitud a *Rickettsia amblyommii*, y de 520 pb del gen *ompA*, 99% de similitud a *Rickettsia amblyomii*.(Tabla 5)

**Tabla 5. Resultados del análisis de los genes 17kDa, *gltA* y *ompA* utilizando la herramienta BLAST® de la pagina web NCBI.(NCBI 2006; Altschul et al. 1990)**

17 kDa (434bp)	<i>gltA</i> (385 bp)	<i>ompA</i> (520bp)
99% similarity to <i>R. amblyommii</i>	99% similarity to <i>R. amblyommii</i>	99% <i>R. amblyommii</i>

Se realizo un análisis de las 13 pulgas colectadas en el area ciscundante a alguna de las casas habitación o extraídas de animales doméstico.

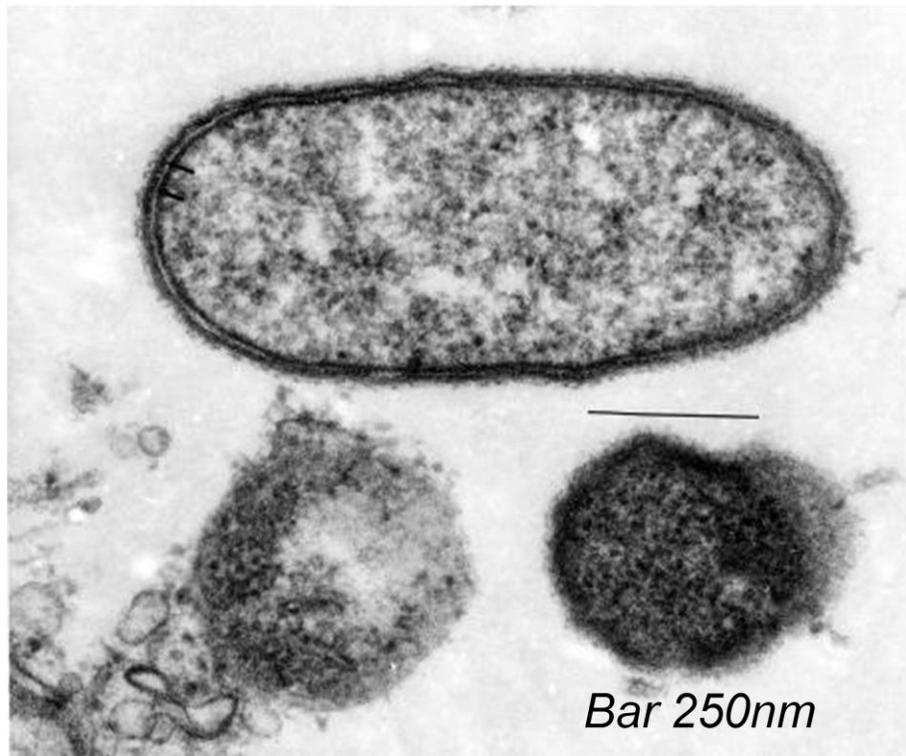
De las 13 *Ctenocephalides canis*, 2 resultaron positivas por amplificación de PCR usando primers la el gen de citrato sintetasa (*gltA*)

Al realizar el análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados se observo una similitud de 100% de los 385pb sometidas al alineamiento del Gene bank® usando la herramienta BLAST®.

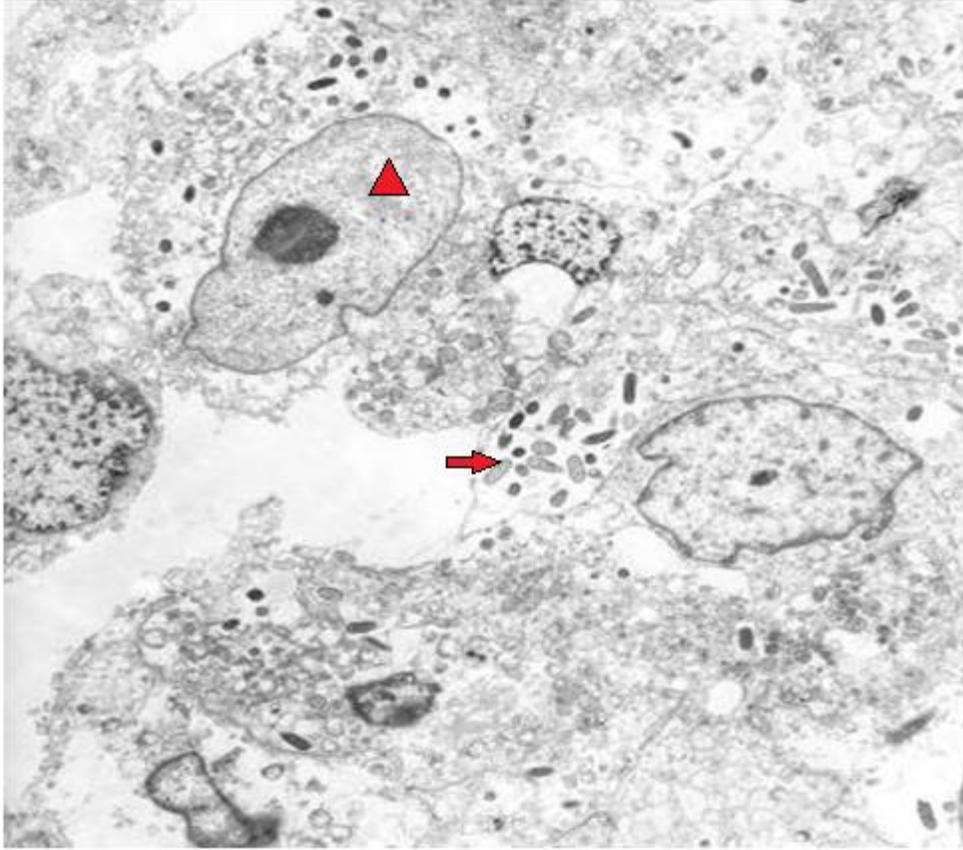
Desgraciadamente no se logro aislar en cultivo celular la rickettsia a partir de las pulgas analizadas.

**Resultados del análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET).**

Gracias a la gran experiencia del Dr. Popov y el Dr. Whitworth se logro obtener imágenes muy claras de *Rickettsia amblyommii*, mostrando la capa microcapsular gruesa que es una característica de esta rickettsia. (Figura 37-38)

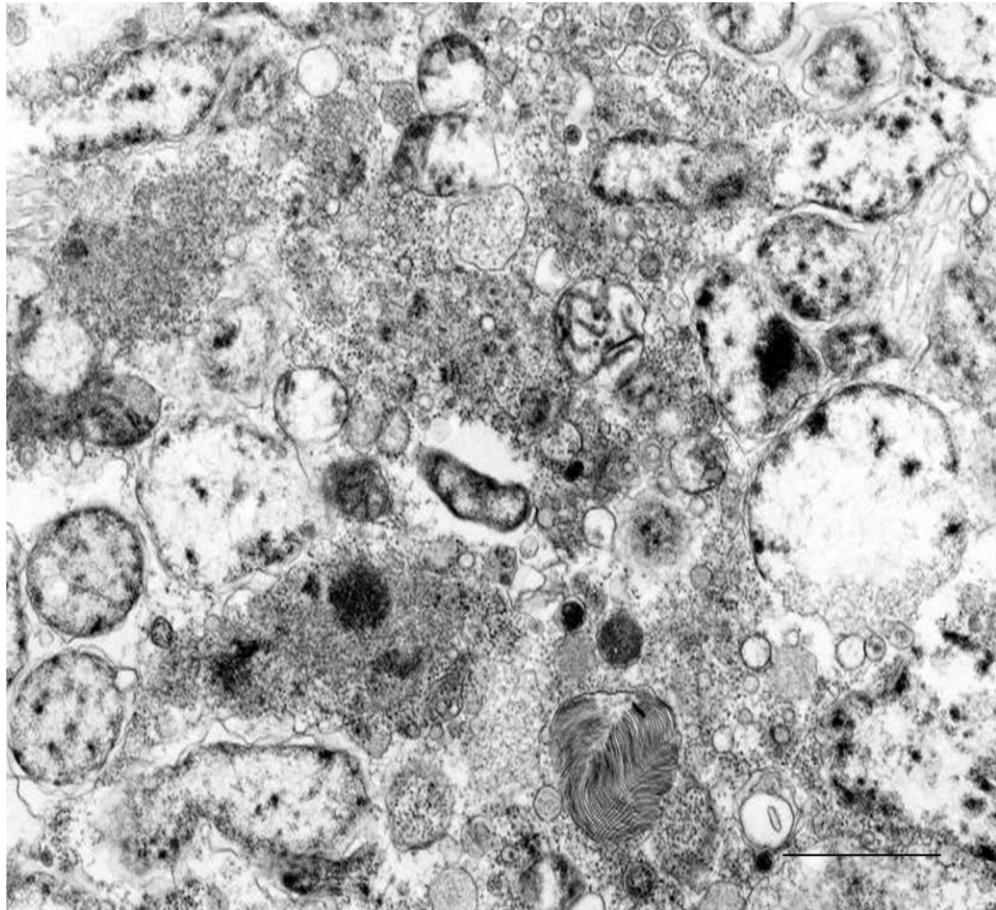


**Figura 37. Fotografía de MET de una *Rickettsia amblyommii sp nov* mostrando la capa microcapsular gruesa que es una característica de esta especie de rickettsia.**



**Figura 38. Fotografía MET donde se observan cúmulos de rickettsias dentro del citosol de células Vero (flecha), también se observa el núcleo de la célula.(triángulo).**

Se logro también observar a la *Rickettsia Amblyommii* dentro del intestino de una garrapata donde también se pudo observar *Wolbachia* un simbiote presente comúnmente en garrapatas. Las *Rickettsiae* típicamente poseen un halo adyacente a la membrana celular. Las *Wolbachia* son bacterias gram-negativo y poseen una pared celular con multicapas.(**Figura 39-40**)



**Figura 39. Fotografía MET de bacterias *Rickettsia* y *Wolbachia* dentro de células epiteliales del intestino de una garrapata del genero *A. cajennense*. Barra: 1.0µm.**



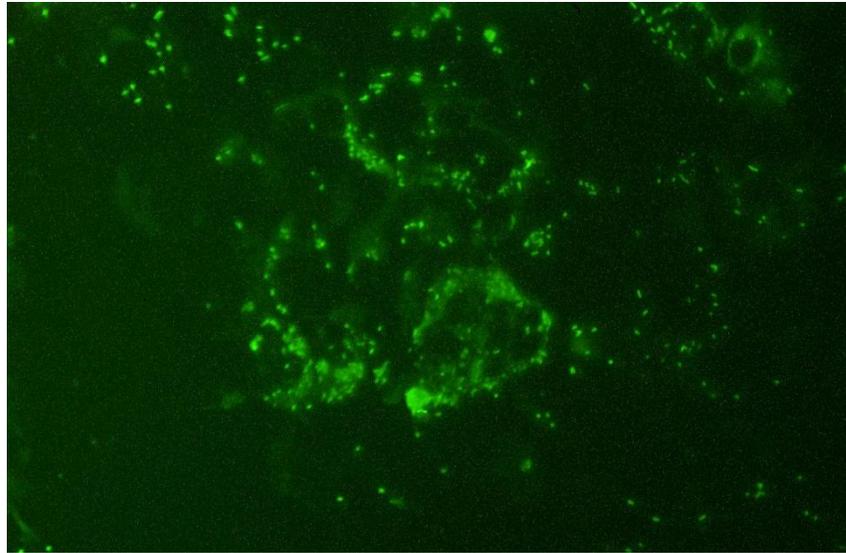
**Figura 40.** Fotografía MET donde se observa un halo electro translucido (flecha), y un endosimbionte bacteriano de garrapata presuntamente *Wolbachia sp.* por la pared celular con multicapas.

### **Resultado de estudio de seroprevalencia de Rickettsiae.**

Se obtuvieron un total de 349 sueros de 396 personas que acudieron a la convocatoria de SSA del estado de Veracruz para este estudio, un 88.13% de la población de Reyixtla, Veracruz.

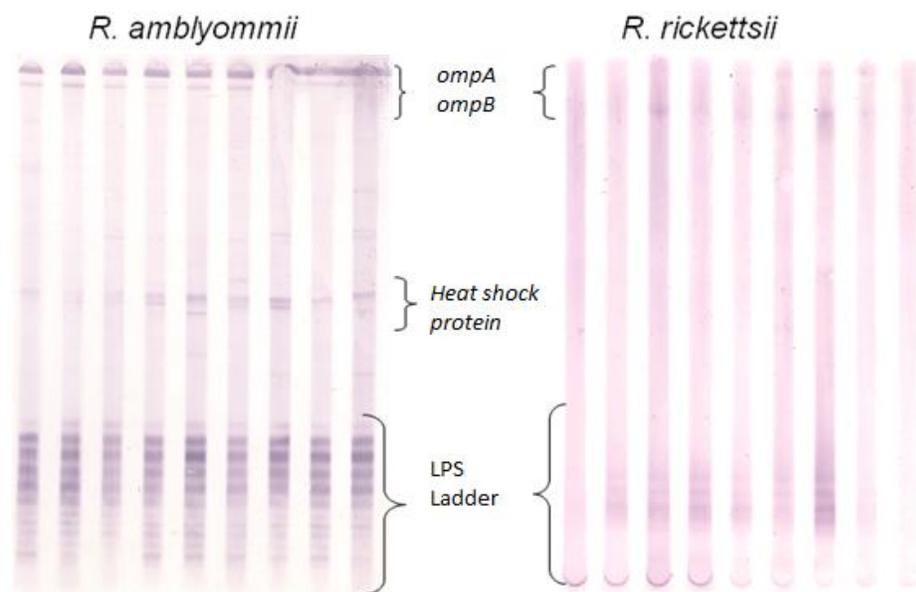
Los resultados del análisis por inmunofluorescencia de estos sueros, mostraron un 75% de la población positiva al antígeno de *R. amblyommii sp nov.* Aislado en este estudio a una dilución de 1:64.(Figura 41) Un 75% de la población arrojó resultados positivos es decir poseían anticuerpos anti *R. amblyommii.* y un 2% resultado positivo a Rickettsia del grupo tifo.

Nota: Se considera resultado positivo una observación a una dilución mínima de 1:64.



**Figura 41.** Imagen de un suero positivo a inmunofluorescencia, usando antígeno de *Rickettsia amblyommii*.

Los resultados de los western immunoblot demostraron la afinidad de los sueros hacia el antígeno de *R. amblyommii* comparado con un antígeno de *R. rickettsii* el cual mostro una leve reacción cruzada. (**Figura 42**)



**Figura 42.** Western blot, para demostrar la reacción cruzada con *R. rickettsii*. Se observa mayor afinidad al antígeno de *R. amblyommii*. Dilución 1:2048.

## DISCUSION

La población de Reyixtla, Veracruz, México, es considerada un sitio endémico de enfermedad de Chagas, desde que las brigadas de SSA del estado visitan este poblado rural. Afortunadamente los programas de control de vectores educaron a los pobladores para identificar al vector triatomino presente en la región, sin embargo estos programas de vectores se limitan a solo buscar un tipo de vector. Al realizar un análisis diferente utilizando las muestras negativas a Chagas, se identifico una alta seroprevalencia de anticuerpos anti rickettsia.

Los resultados de las encuestas realizadas entre los pobladores nos brindaron altos indicios de que el principal vector era la garrapata. La búsqueda de este artrópodo fue fácilmente identificada en la periferia de las casas habitación de la localidad. El clima, altitud y accesibilidad a animales domésticos, como perros, caballos, burros y otros, hacían de este sitio un lugar ideal para el ciclo vital de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), esta garrapata es una de las que mayor distribución tiene en el continente Americano, desde el sur de Estados Unidos, hasta el norte de Argentina. El género *Amblyomma sp-* es capaz de parasitar cualquier especie de vertebrado: anfibio, reptil, ave, o mamífero.(Estrada-Peña et al. 2004)

*Amblyomma cajennense* tiene un ciclo de una generación por año. Las larvas se presentan comúnmente en invierno y los estadios adultos en la temporada de lluvias o verano. (A A Guglielmone et al. 1990).

La identificación del agente etiológico causante de la prevalencia de anticuerpos de rickettsiae, nos dio la evidencia necesaria para convocar a una reunión en la ciudad de Poza Rica, Veracruz e informar a los médicos rurales de SSA. Sobre la presencia de este tipo enfermedades en el estado. Aunque existen reportes desde finales de los años cuarenta cuando el Dr. Bustamante y Dr. Varela, mencionaba (Bustamante & Varela 1947), reportaron la presencia del vector de rickettsiosis, *Amblyomma cajennense*, en ese entonces no se contaban con herramientas para poder identificar exactamente la especie presente en la región, por lo que solo se llegaba a grupo rickettsial mediante. Ellos lograron aislar la rickettsia y determinar que se trataba de *R. rickettsii* debido a que los conejillos de indias presentaron necrosis escrotal y inflamacion de la túnica vaginal testicular. Ahora con los resultados de las secuencias genéticas fue posible identificar de manera mas exacta a *R. amblyommi* como el agente etiológico presente en esta localidad. Existen reportes que mencionan que la posibilidad de que una garrapata se infecte de dos especies de rickettsia del grupo de las fiebres manchada se ve limitada cuando esta ya tiene una infección,(Macaluso et al. 2002) por lo que el hecho que *Amblyomma cajennense* este infectada por *R. amblyommi* reduce la posibilidad de infección transovarial por alguna otra rickettsiae de patogenicidad o virulencia mayor como por ejm. *R.rickettsii*.

La patogenicidad de *R. amblyommii* aun está en debate aunque existen publicaciones que mencionan a esta rickettsia un agente con baja o leve virulencia.(David H Walker et al. 2008) También se reporto en el estado de Carolina del Norte, en Estados Unidos, la presencia de erupciones cutáneas o salpullido en una mujer a la cual se le extrajo una garrapata *Amblyomma americanum* y que al realizar ensayos por PCR y secuenciación del material amplificado se identifico a *R. amblyommi* como el agente etiológico.(Billeter et al. 2007). Esto pone a Reyixtla, Veracruz como un sitio en riesgo, de exponerse a un potencial agente virulento, como en el caso de *R. parkeri*, que era considerado un endosimbionte de *A. maculatum* desde su descubrimiento con el agente maculatum en 1937(RR Parker et al. 1939) y que después de 65 años se demostró que era el causante de una enfermedad similar a la fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR)(Paddock et al. 2004) aunque esta nunca ha sido reportada como un agente infeccioso con riesgos fatales.(David H Walker et al. 2008).

Por lo que es importante vigilar las manifestaciones clínicas de esta población debido a la constante exposición a picaduras de *A. cajennense* para evitar casos fatales o graves o bien utilizar técnicas de control del vector para evitar la diseminación de la bacteria.

## CONCLUSIONES

1. La presencia de *Rickettsia prowazekii* en *Amblyomma imitator* quedo confirmado al obtener las imágenes por microscopia electrónica y observar rickettsiae del grupo tifo, basados en sus características ultraestructurales, además la confirmación de las secuencias genéticas en múltiples ocasiones, dio en todos los casos un <99.99% de similitud *R. prowazekii*. Esto abre la posibilidad a realizar mayores estudios para la atribución o capacidad vectorial de *A. imitator* con vector de *R. prowazekii* que en esta investigación no pudo ser concretada.
2. Por primera vez en México, se logro realizar aislamiento de rickettsiae en cultivo celular utilizando métodos modernos y además las primeras imágenes por microscopia electrónica de transmisión de un aislamiento tanto en cultivo celular como en los órganos de un artrópodo.
3. El aislamiento de *R. amblyommii* de *Amblyomma cajennense* en el estado de Veracruz, es el primero en México, y aunque no existe evidencia de su virulencia en esta población, existe el riesgo latente de que pueda manifestar síntomas de consideración medica. Por ello la conferencia presentada en Poza Rica, Veracruz. sirve como antecedente para que los médicos de esta zona estén atentos a cualquier manifestación clínica anormal causada por la picadura de garrapata.
4. Se demostró que existe una alta seroprevalencia de anticuerpos positivos a *R. amblyomii* en la población de Reyixtla y una alta prevalencia de *R. amblyomii* en garrapatas *A. cajennense* en Reyixtla, Veracruz.
5. La identificación de *R. belli* en garrapatas *Dermacentor variabilis*, es el primer reporte en el país sobre la presencia de esta especie de rickettsia aunque no es considerada una especie virulenta

Estos descubrimientos nos pueden proveer de evidencia que nos lleve a determinar el verdadero origen de la fiebre de tifo y de un reservorio de la infección previamente no reconocido.

Este estudio deja al descubierto que invirtiendo en investigaciones como esta en México, se pueden identificar zonas con riesgo de brote de rickettsiosis y con ello informar y educar a los pobladores y personal de atención medica de estas zonas para evitar más casos fatales, además de que ayuda a que las autoridades apliquen métodos de control más eficientes.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Altschul, S.F. et al., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp.403–10.
- Amano, K. et al., 1992. Serological studies of antigenic similarity between Japanese spotted fever rickettsiae and Weil-Felix test antigens. *Journal of Clinical microbiology*, 30(9), pp.2441–2446.
- Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M. & Azad, A.F., 2008. Laboratory maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Current protocols in Microbiology*, Chapter 3, p.Unit 3A.5.
- Bacellar, F et al., 1995. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. *Epidemiology and Infection*, 114(1), pp.169–78.
- Billeter, S.A. et al., 2007. Detection of *Rickettsia amblyommii* in association with a tick bite rash. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7(4), pp.607–10.
- Bouyer, D.H. et al., 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 51(Pt 2), pp.339–47.
- Bozeman, F.M. et al., 1967. Ecology of Rocky Mountain spotted fever. II. Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16(1), pp.48–59.
- Bozeman, M.F. et al., 1975. Epidemic typhus rickettsiae isolated from flying squirrels. *Nature*, 255(5509), pp.545–547.
- Brossard, M. & Wikel, S K, 2004. Tickimmunobiology. *Parasitology*, 129 Suppl, pp.S161–76.
- Burgdorfer, W. et al., 1973. A search for the epidemic typhus agent in Ethiopian ticks. *Bulletin of the World Health Organization*, 48(5), pp.563–9.
- Burgdorfer, W., 1970. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19(6), pp.1010–4.
- Burgdorfer, W. et al., 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216(4552), pp.1317–1319.
- Burgdorfer, W. & Brinton, L., 1975. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266, pp.61–72.

- Burgdorfer, W. & Varma, M., 1967. Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. *Annual Reviews of Entomology*, (Annual Reviews Inc., Palo Alto, Calif.), pp.347–376.
- Bustamante, M. & Varela, G., 1947. Distribución de La Rickettsiasis En México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 8, pp.3–14.
- Castaneda, M.R., 1935. The antigenic relationship between bacillus proteus x-19 and rickettsiae : iii. A study of the antigenic composition of the extracts of *Bacillus proteus* x-19. *The Journal of Experimental Medicine*, 62(3), pp.289–96.
- Chen, D.Q., Campbell, B.C. & Purcell, A.H., 1996. A new rickettsia from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Current Microbiology*, 33(2), pp.123–8.
- Cohan, F.M., 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*, 56, pp.457–487.
- Conlon, J.M., 1999. The Historical Impact of Epidemic Typhus. Insect Disease and History. *Montana State University*.
- Cox, H.R., 1938. Use of yolk sac of developing chick embryo as médium for growing rickettsiae of Rocky mountain spotted fever and typhus group. *Public Health Report*, 53, pp.2241–2247.
- Cunha, B.A., 2004. The cause of the plague of Athens: plague, typhoid, typhus, smallpox, or measles? *Infectious disease clinics of North America*, 18(1), pp.29–43.
- Dasch, G.A. & Weiss, E., 1977. Characterization of the Madrid E strain of Rickettsia prowazekii purified by renografin density gradient centrifugation. *Infection and Immunity*, 15(1), pp.280–6.
- Davis, M.J. et al., 1998. Rickettsial relative associated with papaya bunchy top disease. *Current Microbiology*, 36(2), pp.80–4.
- Drancourt, M et al., 1998. Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp.12637–40.
- Dumler, J.S. et al., 1991. Identification of Ehrlichia in human tissue. *The New England Journal of Medicine*, 325(15), pp.1109–10.
- Dyer, R, E., Rumreich, A. & Badger, L, F., 1931. Typhus fever: A virus of the typhus type derived from fleas collected from wild rats. *Public Health Report*, 46, pp.334–338.

- Eremeeva, M.E., 2012. Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(5-6), pp.332–7.
- Estrada-Peña, A., Guglielme, A A & Mangold, A.J., 2004. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98(3), pp.283–92.
- Ewald, P., 1994. Evolution of infectious disease. In New York: Oxford University Press, p. 41.
- Farhang-Azad, A., Traub, R. & Baqar, S., 1985. Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in *Xenopsylla cheopis* fleas. *Science*, (227), pp.543–545.
- Fiset, P. et al., 1969. A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. *Acta Virologica*, 13(1), pp.60–66.
- Fournier, P.-E. et al., 2003. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *Journal of clinical microbiology*, 41(12), pp.5456–65.
- Furuya, Y. et al., 1993. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), pp.1637–40.
- Furuya, Y. et al., 1995. Specific amplification of *Rickettsia japonica* DNA from clinical specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(2), pp.487–9.
- Gevers, D. et al., 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), pp.733–9.
- Gimenez, D.F., 1964. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technology*, 39, pp.135–40.
- Guglielme, A A et al., 1990. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, northwest Argentina. *Veterinary Parasitology*, 35(1-2), pp.93–101.
- Halle, S., Dasch, G.A. & Weiss, E., 1977. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against typhus rickettsiae, *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 6(2), pp.101–10.
- Hansen, W. & Freney, J., 1996. Le typhus épidémique, sa transmission et la découverte de L`agent étiologique. *Lyon Pharmaceutique*, 47(3), pp.130–138.

- Hayes, S.F., Burgdorfer, W. & Aeschlimann, A., 1980. Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infection and immunity*, 27(2), pp.638–42.
- Huebner, R., Jellison, W. & Armstrong, C., 1947. Rickettsialpox: a newly recognized rickettsial disease. V. Recovery of *Rickettsia akari* from a house mouse (*Mus musculus*). *Public Health Report*, 62, pp.777–780.
- Kantsø, B. et al., 2009. Evaluation of serological tests for the diagnosis of rickettsiosis in Denmark. *Journal of microbiological methods*, 76(3), pp.285–8.
- Kaplowitz, L.G. et al., 1983. Correlation of rickettsial titers, circulating endotoxin, and clinical features in Rocky Mountain spotted fever. *Archives of internal medicine*, 143(6), pp.1149–51.
- Keirans, J.E. & Durden, L.A., 1998a. Illustrated key to nymphs of the tick genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) found in the United States. *Journal of medical entomology*, 35(4), pp.489–95.
- Keirans, J.E. & Durden, L.A., 1998b. Illustrated key to nymphs of the tick genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) found in the United States. *Journal of medical entomology*, 35(4), pp.489–95.
- Kelly, P.J., Raoult, D & Mason, P.R., 1991. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(3), pp.397–8.
- Kikuchi, Y. & Fukatsu, T., 2005. *Rickettsia* infection in natural leech populations. *Microbial ecology*, 49(2), pp.265–71.
- Kohls, G., 1958. *Amblyomma imitator*, a new species of tick from Texas and Mexico, and remarks on the synonymy of *A. cajennense* (Fabricius) (Acarina-Ixodidae). *The Journal of Parasitology*, 44(4, Section 1), pp.430–3.
- Labruna, M.B. et al., 2005. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Veterinary parasitology*, 127(2), pp.169–74.
- Labruna, M.B. et al., 2007. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microbial ecology*, 54(1), pp.126–33.
- Labruna, M.B. et al., 2004. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), pp.90–98.

- Macaluso, K.R. et al., 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. *Journal of medical entomology*, 39(6), pp.809–13.
- Maeda, K. et al., 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *The New England journal of medicine*, 316(14), pp.853–6.
- Marrero, M. & Raoult, D, 1989. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(2), pp.197–9.
- Martinez, J.J. et al., 2005. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*, 123(6), pp.1013–23.
- Martinez, J.J. & Cossart, P., 2004. Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 21), pp.5097–106.
- Massung, R.F. et al., 2001. Epidemic typhus meningitis in the southwestern United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), pp.979–82.
- Maxcy, K.F., 1926. Typhus Fever in the United States. *Public Health Report*, (44), pp.1738–1742.
- McDade, J.E., 1990. Evidence supporting the hypothesis that rickettsial virulence factors determine the severity of spotted fever and typhus group infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 590, pp.20–6.
- McDade, J.E. et al., 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England journal of medicine*, 297(22), pp.1197–203.
- Medina-Sanchez, A. et al., 2005. Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063, pp.327–32.
- Merck Sharp & Dohme, 2005. Infecciones producidas por rickettsias. *Manual Merck de Informacion Medica para el Hogar*, p.17:183.
- NCBI, 2006. Basic Local Alignment Search Tool.  
[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).
- Nigg, C., 1932. Studies on the cultivation of the typhus fever rickettsia in the presence of live tissue. *Journal of Experimental Medicine*, 55(4), pp.563–576.

- Ocaranza, F., Florescano, E. & Malvido, E., 1981. Las grandes epidemias del siglo XVI en la Nueva España. In Ciudad de Mexico: IMMS, p. 201.
- Olano, J.P., 2001. *Rickettsia/Ehrlichia IFA Procedure*, Galveston, Texas.
- Oliveira, K.A. et al., 2010. Amblyomma imitator ticks as vectors of Rickettsia rickettsii, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 16(8), pp.1282–4.
- Paddock, C.D. et al., 2004. Rickettsia parkeri: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(6), pp.805–11.
- Parker, RR et al., 1939. Observations on an infectious agent from Amblyomma maculatum. *Public Health Report*, 54, pp.1482–1484.
- Parola, P. & Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), pp.897–928.
- Perez Tamayo, R., 1985. Enfermedades viejas y enfermedades nuevas. In Mexico: Siglo XXI Eds, p. 279.
- Philip, C.B. & Parker, R., 1933. Rocky Mountain spotted fever. Investigation of sexual transmission in the wood tick *Dermacentor andersoni*. *Public Health Report*, 48, pp.266–272.
- Philip, R.N. et al., 1977. A comparison of serologic methods for diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *American Journal of Epidemiology*, 105(1), pp.56–67.
- Philip, R.N. & Casper, E.A., 1981. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in western Montana. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(1), pp.230–8.
- Raoult, D & Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), pp.694–719.
- Raoult, Didier et al., 2006. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon’s Grand Army in Vilnius. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(1), pp.112–20.
- Raoult, Didier, Woodward, T. & Dumler, J.S., 2004. The history of epidemic typhus. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(1), pp.127–140.
- Regnery, R., Martin, M. & Olson, J., 1992. Naturally occurring “*Rochalimaea henselae*” infection in domestic cat. *Lancet*, 340(8818), pp.557–8.

- Regnery, R.L., Spruill, C.L. & Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173(5), pp.1576–89.
- Reiss-Gutfreund, R.J., 1955. [Isolation of *Rickettsia prowazekii* strains from the blood of domestic animals in Ethiopia and from their ticks]. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, 48(5), pp.602–7.
- Reiss-Gutfreund, R.J., 1961. [New isolations of *R. prowazeki* from domestic animals and ticks]. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, 54(Mar-Apr), pp.284–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13740680> [Accessed January 30, 2012].
- Reiss-Gutfreund, R.J., 1966. The isolation of *Rickettsia prowazekii* and *mooseri* from unusual sources. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 15(6), pp.943–9.
- Roux, V. et al., 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), pp.252–61.
- Schattner, A. et al., 1992. Case report: fatal seronegative rickettsial infection diagnosed by the polymerase chain reaction. *The American Journal of the Medical Sciences*, 303(6), pp.392–4.
- La Scola, B. & Raoult, D., 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), pp.2715–27.
- Shepard, C.C. et al., 1976. Recent experience with the complement fixation test in the laboratory diagnosis of rickettsial diseases in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(3), pp.277–83.
- De Sousa, R. et al., 2003. Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, pp.285–94.
- Spencer, R. & Parker, RR, 1923. Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. *Public Health Report*, 38, pp.333–339.
- Stothard, Diane R. & Fuerst, P.A., 1995. Evolutionary Analysis of the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* Using 16S rRNA Gene Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(1), pp.52–61.
- Sugita, Y. et al., 1992. Diagnosis of typhus infection with *Rickettsia tsutsugamushi* by polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*, 37(5), pp.357–60.

- Sylbalski, W., 1999. Maintenance of Human-Fed Live Lice In the Laboratory And Production of Weigl's Exanthematous typhus vaccine. Maintenance of Human, Animal and Plant Pathogen Vectors. In Enfieldm, USA: Science Publishersm, pp. 161–180.
- Tamura, A. et al., 1984. Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. *Microbiology and Immunology*, 28(8), pp.873–82.
- Traub, R. & Wisseman, C.L., 1978. The ecology of murine typhus a critical review. *Tropical Disease Bulletin*, (75), pp.237–317.
- Tzianabos, T., Anderson, B.E. & McDade, J.E., 1989. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *Journal of clinical microbiology*, 27(12), pp.2866–8.
- Uchiyama, T., 2003. Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, pp.585–90.
- Uchiyama, T., Kawano, H. & Kusuhara, Y., 2006. The major outer membrane protein rOmpB of spotted fever group rickettsiae functions in the rickettsial adherence to and invasion of Vero cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 8(3), pp.801–9.
- Walker, David H, 2004. Ricketts creates rickettsiology, the study of vector-borne obligately intracellular bacteria. *The Journal of infectious diseases*, 189(5), pp.938–55.
- Walker, David H, 2007. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45 Suppl 1, pp.S39–44.
- Walker, David H, Paddock, C.D. & Dumler, J.S., 2008. Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections. *The Medical Clinics of North America*, 92(6), pp.1345–61, X.
- Walker, T.S. & Winkler, H.H., 1978. Penetration of cultured mouse fibroblasts (L cells) by *Rickettsia prowazeki*. *Infection and immunity*, 22(1), pp.200–8.
- Webb, L. et al., 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), pp.530–4.
- Weil, E. & Felix, A., 1916. Serologischen Diagnose des Flekfiebers. *Wien. Klin Wechenschr*, (29), pp.33–35.

- Weiss, E. & Dressler, H.R., 1960. Centrifugation and Rickettsiae and viruses onto cells and its effect on infection. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 103, pp.691–5.
- Wilson, L.B. & Chowning, W.M., Classics in infectious diseases. Reprinted from The Journal of Infectious Diseases 1:31-57, 1904. Studies in Pyroplasmosis Hominis (“Spotted Fever” or “Tick Fever” of the Rocky Mountains). *Reviews of infectious diseases*, 1(3), pp.540–58.
- Woodward, T.E., 1982. Murine and epidemic typhus rickettsiae: how close is their relationship? *The Yale journal of biology and medicine*, 55(3-4), pp.335–41.
- Yu, X.J., Walker, D.H., 2005. Genus I. Rickettsia da Rocha-Lima 1916. . . Edited by New York: Springer. In & S. J. T. Brenner D.J., Krieg N.R., & Garrity, G.M., ed. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn., vol. 2 (The Proteobacteria)*. New York: Springer, pp. 96–106.
- Zinsser, H & Castaneda, M., 1933. On the isolation from a case of Brill’s disease of a typhus strain resembling the European type. *New England Journal of Medicine*, (209), pp.815–819.
- Zinsser, Hans, 1935. *Rats Lice and history*, Boston, MA: Little, Brown, & Co.

## APENDICES

### Apéndice A.- Resultados de inmunofluorescencias, del estudio realizado en los municipios de Allende y Linares, Nuevo León, México.

UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH.

PATHOLOGY DEPARTMENT.

RESULT IFA SAMPLES SSA - UANL NUEVO LEON MEXICO.

Edad	Sex	County	Colony	# SSA	# UTMB	Ig R. typhi		Ig R. prowazekii		Ig R. prowazekii		Conclusion
						1er Screening		2do Screening		3er Screening		
						IFA	Titer	IFA	Titer	IFA	Titer	
		4=Allende 33=Linares										
7	2	4	17	1544	1	negativa		neg		neg		negativa
18	1	4	21	1448	2	negativa				neg	0	negativa
28	1	4	6	1445	3	negativa				pos	1:240	R. prowazekii
28	2	4	23	1836	4	negativa		neg		neg		negativa
24	1	4	48	1453	5	negativa				pos	1:240	R. prowazekii
32	1	4	13	1452	6	negativa				neg	0	negativa
33	1	4	38	1833	7	negativa				neg	0	negativa
66	2	4	21	1837	8	negativa				neg		negativa
38	2	4	38	1831	9	negativa				neg	0	negativa
71	2	4	17	1444	10	negativa				neg		negativa
28	1	4	33	1545	11	positiva	1:64	pos	1:64			R. typh/prowa.
18	1	4	21	1835	12	negativa				neg		negativa
25	1	4	23	1832	13	positiva	1:64	neg				R. typhi.
24	2	4	15	1456	14	negativa				neg		negativa
38	1	4	49	1454	15	positiva	1:128	pos	1:128			R. typh/prowa.
32	1	4	21	145	16	negativa				pos	1:64	R. prowazekii
27	2	4	23	1455	17	negativa				neg		negativa
40	1	4	17	1446	18	negativa		neg		neg		negativa
23	1	4	7	1838	19	negativa		neg		neg	0	negativa
67	1	4	46	1447	20	negativo				neg	0	negativa
21	1	33	99	2274	21	negativa				neg		negativa
17	2	4	13	345	22	negativa				neg		negativa
22	1	4	1	413	23	positiva	1:64	pos	1:64			R. typh/prowa.
6	2	4	7	412	24	negativa	1:128			pos	1:64	R. typh/prowa.
11	1	33	55	2329	25	negativa				neg		negativa
23	1	33	53	2309	26	negativa		neg				negativa
22	2	4	10	1449	27	positiva	1:64	pos	1:64			R. typh/prowa.
18	1	4	9	1450	28	negativa		neg		pos	1:128	R. prowazekii
22	1	4	47	1451	29	negativo		neg		pos	1:240	R. prowazekii
35	1	4	7	546	30	negativa				neg	0	negativa
12	2	33	55	2286	31	positiva	1:64	pos	1:64			R. typh/prowa.
21	1	33	53	2305	32	negativa				pos	1:128	R. prowazekii
28	1	33	57	2330	33	negativa				pos	1:540	R. prowazekii
40	1	33	106	2271	34	negativo				neg		negativa

25	1	4	17	592	35	positiva	1:64	pos	1:128			<i>R. prowazekii</i>
28	1	4	7	409	36	negativa				pos	1:240	<i>R. prowazekii</i>
8	1	33	60	2269	37	positiva	1:64	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
30	2	33	84	2346	38	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
48	1	33	99	2326	39	negativo				neg		negativa
7	2	33	84	2345	40	positiva	1:128	neg				<i>R. typhi.</i>
40	1	33	53	2281	41	negativa				neg		negativa
10	1	33	112	2340	42	negativa				neg		negativa
60	2	33	55	2323	43	negativa				neg		negativa
30	1	4	7	595	44	negativa				neg		negativa
55	1	33	55	2270	45	negativa				neg		negativa
13	1	4	13	587	46	positiva	1:64	neg		neg		<i>R. typhi.</i>
17	1	4	10	406	47	negativa				neg		negativa
51	1	4	7	547	48	negativa				neg		negativa
19	1	33	53	2287	49	positiva	1:64	neg		neg		<i>R. typhi.</i>
50	9	33	53	2294	50	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
14	1	33	128	2343	51	negativa				neg		negativa
17	1	4	9	551	52	negativa				neg		negativa
60	1	33	99	2273	53	negativa				neg		negativa
36	1	33	56	2327	54	negativa				neg		negativa
24	1	4	35	589	55	negativa				pos	1:240	<i>R. prowazekii</i>
11	1	33	53	2290	56	negativa				neg		negativa
25	2	4	36	591	57	negativa				neg		negativa
9	2	4	8	463	58	negativa				neg		negativa
23	1	33	53	2282	59	negativa				neg		negativa
60	1	33	65	2325	60	negativa				neg		negativa
31	1	33	65	2324	61	positiva	1:128	neg		pos	1:540	<i>R. prowazekii</i>
19	2	33	53	2284	62	negativa				neg		negativa
18	2	4	32	593	63	negativa				neg	0	negativa
37	2	33	53	2296	64	negativa				neg		negativa
30	2	4	32	552	65	negativa				neg	0	negativa
28	1	33	53	2312	66	negativa				neg	0	negativa
17	1	4	33	585	67	negativa		neg		neg	0	negativa
26	2	4	1	414	68	negativa				neg		negativa
80	1	33	52	2344	69	negativa				neg		negativa
33	1	33	53	2278	70	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi.</i>
20	1	33	53	2332	71	negativa		neg		neg		negativa
14	1	33	53	2301	72	negativa				neg		negativa
25	1	4	9	410	73	negativa				neg		negativa
35	1	4	7	546	74	negativa				neg		negativa
19	1	4	7	411	75	negativa		neg		neg		negativa
36	1	33	53	2288	76	positiva	1:128	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
10	1	4	13	404	77	negativa				neg		negativa
33	1	4	1	408	78	positiva	1:128	neg				<i>R. typhi.</i>
32	1	33	53	2280	79	negativa				neg		negativa
42	1	4	6	347	80	negativa				neg		negativa
30	2	33	55	2272	81	negativa				neg		negativa
42	99	4	8	545	82	negativa				neg		negativa
45	1	33	53	2283	83	negativa				neg		negativa

12	1	33	89	2342	84	negativa				neg		negativa
62	1	4	31	550	85	negativa				neg		negativa
17	1	4	13	464	86	positiva	1:64	pos	1:128			<i>R. prowazekii</i>
25	2	4	34	588	87	negativa				neg	0	negativa
32	2	4	5	586	88	negativa				neg	0	negativa
17	1	33	53	2314	89	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
16	2	33	53	2276	90	negativa				neg		negativa
26	2	33	54	2339	91	negativa	1:64	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
33	1	4	7	346	92	positiva	1:64	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
32	1	4	29	407	93	positiva	1:64	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
24	1	33	55	2341	94	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi.</i>
24	1	4	7	415	95	negativa				neg		negativa
25	2	33	55	2328	96	positiva	1:256	neg		neg		<i>R. typhi.</i>
37	2	4	30	548	97	positiva	1:256	neg				<i>R. typhi.</i>
61	1	33	68	2331	98	positiva	1:256	neg				<i>R. typhi.</i>
39	1	33	88	2333	99	negativa				neg		negativa
59	2	33	93	2322	100	negativa				neg		negativa
20	1	4	4	258	101	negativa				neg		negativa
21	1	4	3	30	102	negativa				neg		negativa
55	1	4	9	1210	103	negativa				neg	0	negativa
58	2	33	77	683	104	negativa				neg		negativa
59	2	33	73	651	105	negativa				neg		negativa
56	1	33	62	399	106	negativa				neg		negativa
71	1	33	64	393	107	negativa				neg		negativa
20	1	33	74	663	108	negativa				neg		negativa
22	1	4	44	1212	109	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
19	1	4	22	134	110	negativa				pos	1:128	<i>R. prowazekii</i>
18	2	33	74	662	111	positiva	1:256	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
62	1	4	1	125	112	negativa	1:256	pos	1:256			<i>R. typh/prowa.</i>
54	1	4	7	221	113	positiva	1:64	neg	0			<i>R. typhi.</i>
0	1	4	18	265	114	negativa				neg	0	negativa
66	2	4	8	130	115	negativa				neg		negativa
38	2	4	6	56	116	positiva	1:64	neg	0			<i>R. typhi.</i>
76	1	4	4	597	117	positiva	1:128	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
46	1	4	1	224	118	negativa	0	neg		pos		negativa
31	2	33	75	670	119	negativa				neg		negativa
23	1	4	23	198	120	negativa				neg		negativa
60	1	4	1	129	121	negativa				neg		negativa
22	1	4	17	1214	122	negativa				neg		negativa
28	1	4	6	229	123	negativa				neg		negativa
14	1	4	6	259	124	negativa				neg		negativa
30	2	4	21	199	125	negativa				neg		negativa
59	1	4	5	32	126	negativa				positiva	1:64	<i>R. prowazekii</i>
24	1	33	84	2348	127	negativa				neg		negativa
36	1	33	78	692	128	negativa				neg		negativa
7	2	4	6	34	129	negativa				neg		negativa
41	1	4	7	35	130	negativa				neg		negativa
56	1	4	7	1211	131	negativa				neg		negativa
38	2	4	3	1204	132	negativa				neg		negativa

35	1	4	21	59	133	negativa				neg		negativa
74	2	33	64	396	134	negativa				pos	1:128	<i>R. prowazekii</i>
37	2	33	76	672	135	negativa				neg		negativa
37	1	4	3	33	136	negativa				neg		negativa
27	1	33	73	653	137	negativa				neg		negativa
62	2	33	77	680	138	negativa				neg		negativa
47	1	4	18	296	139	negativa		neg		neg		negativa
30	1	4	21	230	140	positiva	1:128	neg		neg		<i>R. typhi</i>
30	2	4	9	217	141	negativa				neg		negativa
44	1	4	20	131	142	negativa				neg		negativa
44	1	33	75	668	143	negativa				neg		negativa
7	2	4	17	234	144	negativa				neg		negativa
58	1	4	11	39	145	negativa				neg		negativa
16	1	4	9	37	146	negativa				neg		negativa
70	2	4	10	38	147	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
37	1	33	76	681	148	negativa				neg		negativa
69	1	4	1	1206	149	negativa				neg		negativa
22	2	33	77	684	150	negativa				neg		negativa
4	2	33	53	252	151	negativa				neg		negativa
36	2	33	73	654	152	positiva	1:256	pos	1:256			<i>R. typh/prowa.</i>
59	2	33	59	320	153	positiva	1:128	pos	1:64	neg		<i>R. typh/prowa.</i>
35	1	4	21	228	154	negativa				neg		negativa
21	2	4	43	1208	155	negativa				neg		negativa
20	1	4	21	140	156	negativa				neg		negativa
31	1	33	84	2347	157	negativa				neg		negativa
62	2	4	21	133	158	negativa				neg		negativa
41	1	33	93	2352	159	negativa				neg		negativa
37	2	33	77	678	160	negativa				neg		negativa
45	1	4	17	1202	161	negativa				neg		negativa
26	1	4	13	48	162	negativa				neg		negativa
31	1	33	78	691	163	negativa				neg		negativa
47	1	4	1	344	164	positiva	1:128	pos	1:128			<i>R. typh/prowa.</i>
48	1	33	63	391	165	negativa				neg		negativa
38	1	4	3	1205	166	negativa				neg		negativa
38	1	4	7	136	167	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
70	1	33	74	666	168	negativa				neg		negativa
40	1	4	6	135	169	positiva	1:128	neg		neg		<i>R. typhi</i>
42	1	4	8	36	170	negativa				neg		negativa
99	99	99	99	403	171	negativa				neg		negativa
9	1	4	24	218	172	negativa				neg		negativa
12	2	4	7	137	173	negativa		neg		neg		negativa
31	2	33	60	598	174	negativa				neg		negativa
35	2	33	76	675	175	negativa				neg		negativa
26	1	33	76	673	176	positiva	1:128	pos	1:246			<i>R. prowa/typhy</i>
24	1	4	8	139	177	negativa				neg		negativa
21	1	33	78	687	178	negativa				neg		negativa
20	1	4	42	1207	179	negativa				neg		negativa
72	2	4	14	52	180	positiva	1:64	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
76	1	4	2	29	181	negativa				neg		negativa

28	2	4	23	1058	182	negativa				neg		negativa
38	1	4	9	1192	183	negativa				neg		negativa
72	1	4	41	1200	184	positiva	1:128	neg				<i>R. typhi</i>
54	2	4	40	1190	185	negativa		neg		neg		negativa
26	2	4	7	1071	186	negativa				neg		negativa
21	1	4	38	1063	187	negativa				neg		negativa
74	1	4	9	1188	188	negativa				neg		negativa
14	2	4	7	1059	189	negativa				neg		negativa
39	1	4	9	1189	190	negativa				neg		negativa
27	1	4	17	1191	191	negativa				neg		negativa
51	2	4	1	1066	192	negativa				neg		negativa
21	1	4	29	1062	193	negativa				neg		negativa
27	1	4	9	1187	194	negativa				neg		negativa
21	1	4	1	1069	195	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
45	1	4	17	1194	196	negativa				pos	1:64	<i>R. prowazekii</i>
47	2	4	1	1067	197	negativa				pos	1:128	<i>R. prowazekii</i>
40	2	4	37	1061	198	negativa				neg		negativa
73	2	33	70	610	199	negativa				neg		negativa
48	1	33	62	402	200	negativa				neg		negativa
5	2	33	56	257	201	negativa				neg		negativa
68	2	33	73	655	202	negativa				neg		negativa
55	1	33	63	385	203	negativa				neg		negativa
62	2	33	77	680	204	negativa				neg		negativa
39	1	33	78	686	205	negativa				neg		negativa
58	1	33	63	388	206	positiva	1:128	pos	1:128			<i>R. typh/prowa.</i>
68	2	4	27	226	207	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi</i>
56	2	33	74	664	208	negativa				neg		negativa
27	1	33	73	652	209	negativa				neg		negativa
33	1	33	74	661	210	negativa				neg		negativa
46	1	33	68	603	211	negativa				neg		negativa
22	2	33	77	684	212	negativa				neg		negativa
65	1	33	74	658	213	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi</i>
19	1	33	65	601	214	positiva	0	neg		neg		negativa
36	1	4	7	219	215	negativa				neg		negativa
56	1	4	21	227	216	negativa				neg		negativa
64	2	4	1	4	217	negativa				neg		negativa
17	2	33	61	379	218	positiva	1:64	pos	1:128			<i>R.prowa/ tiphy</i>
61	2	33	76	674	219	negativa				neg		negativa
44	1	4	1	232	220	negativa				neg		negativa
50	1	33	63	386	221	negativa				neg		negativa
35	1	33	62	398	222	negativa				neg		negativa
61	1	33	77	679	223	negativa				neg		negativa
64	1	33	74	659	224	negativa				neg		negativa
61	1	4	26	225	225	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi</i>
63	2	33	66	600	226	negativa				neg		negativa
83	1	33	62	382	227	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi</i>
9	2	4	25	222	228	negativa				pos	1:240	<i>R. prowazekii</i>
35	1	33	59	319	229	negativa		neg		neg		negativa
42	1	4	5	297	230	negativa				neg		negativa

47	2	4	5	296	231	negativa		pos	1:128	neg		<i>R. prowazekii</i>
99	99	99	99	289	232	negativa				neg		negativa
52	2	4	9	50	233	negativa				neg		negativa
60	1	4	28	233	234	negativa				neg		negativa
59	2	33	63	387	235	positiva	1:512	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
21	2	33	55	380	236	negativa		neg		neg		negativa
31	1	33	78	694	237	negativa				neg		negativa
29	1	33	75	671	238	negativa				neg		negativa
13	2	4	1	132	239	negativa				neg		negativa
18	1	33	93	2334	240	negativa				neg		negativa
69	1	33	64	395	241	negativa		neg		neg		negativa
49	1	33	112	2338	242	negativa		neg		neg		negativa
26	1	33	76	682	243	negativa				neg		negativa
16	1	33	57	2355	244	positiva	1:64	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
41	1	33	73	657	245	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi.</i>
50	1	33	55	256	246	positiva	1:64	neg				<i>R. typhi.</i>
26	1	33	74	660	247	negativa				neg		negativa
13	1	33	84	2335	248	positiva	1:256	pos	1:128			<i>R. typh/prowa.</i>
22	2	33	69	608	249	negativa				?		negativa
27	2	33	53	254	250	negativa		neg		neg		negativa
23	1	33	62	381	251	negativa				neg		negativa
62	2	33	56	2354	252	negativa				neg		negativa
64	1	4	5	235	253	negativa	0	neg		pos		negativa
8	1	33	53	255	254	positiva	1:256			pos	1:64	<i>R. typh/prowa.</i>
28	1	33	78	695	255	positiva	1:128	pos	1:64			<i>R. typh/prowa.</i>
35	1	33	55	604	256	negativa				neg		negativa
75	1	33	63	390	257	negativa				neg		negativa
70	2	4	12	40	258	negativa				neg		negativa
23	1	4	4	31	259	negativa				neg		negativa
13	1	4	21	1209	260	negativa				neg		negativa
3	2	33	86	2350	261	negativa				neg		negativa
28	1	33	70	611	262	negativa				neg		negativa
34	2	33	57	897	263	positiva	1:128	neg		neg		<i>R. typhi.</i>
31	1	33	70	615	264	positiva	1:64	pos	1:128			<i>R.prowa/ typhy</i>
27	1	33	59	928	265	negativa		pos	1:128	neg		<i>R. prowazekii</i>
45	1	33	78	689	266	negativa				neg		negativa
39	1	33	80	900	267	negativa				neg		negativa
4	2	33	84	906	268	negativa		neg		neg		negativa
99	99	99	99	150	269	negativa				pos	1:128	<i>R. prowazekii</i>
61	2	33	67	602	270	negativa				neg		negativa
38	1	33	75	669	271	negativa		neg		neg		negativa
18	1	4	6	231	272	negativa				pos	1:256	<i>R. prowazekii</i>
45	2	33	64	394	273	negativa				neg		negativa
65	1	4	13	128	274	positiva	1:256	neg				<i>R. typhi.</i>
75	2	4	19	127	275	negativa				neg		negativa
6	1	33	54	253	276	negativa				neg		negativa
19	1	33	88	915	277	negativa				neg		negativa
1	2	33	86	909	278	positiva	1:256	neg				<i>R. typhi.</i>
17	1	33	91	927	279	negativa	0	neg		neg		negativa

45	1	4	15	220	280	negativa				neg		negativa
23	1	4	37	1060	281	negativa				neg		negativa
8	2	33	53	903	282	negativa	1:256	pos	1:128			R. typh/prowa.
7	1	33	57	2349	283	positiva	1:64	neg				R. typhi.
24	1	4	7	46	284	negativa				neg		negativa
35	1	33	76	676	285	negativa				neg		negativa
63	1	33	85	913	286	negativa				neg		negativa
32	2	33	89	916	287	negativa				neg		negativa
78	1	33	93	996	288	negativa				neg		negativa
52	1	33	63	383	289	negativa				neg		negativa
36	1	4	4	223	290	negativa				neg		negativa
34	2	33	61	2351	291	negativa		neg		neg		negativa
6	1	33	60	321	292	negativa		neg		neg		negativa
25	1	4	23	201	293	negativa	1:128	pos	1:64			R. typh/prowa.
19	1	33	70	622	294	positiva	1:64	neg				R. typhi.
0.1	2	33	53	899	295	positiva	1:64	neg				R. typhi.
51	1	33	53	917	296	negativa				neg		negativa
7	1	33	83	905	297	negativa				neg		negativa
42	1	33	85	922	298	negativa				neg		negativa
35	1	33	73	656	299	negativa				neg		negativa
47	2	4	15	138	300	negativa				neg		negativa
38	1	4	7	47	301	negativa				pos	1:64	R. prowazekii
3	1	4	38	919	302	negativa				neg		negativa
26	1	4	15	54	303	negativa				pos	1:64	R. prowazekii
58	1	33	62	397	304	negativa				neg		negativa
10	1	4	13	216	305	negativa				neg		negativa
17	1	4	17	918	306	positiva	1:128	neg				R. typhi.
63	2	33	56	1002	307	negativa				neg		negativa
64	1	33	82	904	308	negativa				neg		negativa
70	1	33	89	2353	309	negativa				neg		negativa
55	2	4	18	126	310	positiva	1:256	neg				R. typhi.
17	1	4	16	1201	311	negativa				neg		negativa
58	1	33	72	624	312	negativa				neg		negativa
58	1	33	74	665	313	negativa				neg		negativa
15	2	33	53	2356	314	negativa				neg		negativa
68	2	4	13	301	315	positiva	1:512	pos	1:512			R. typh/prowa.
19	1	33	92	929	316	negativa				neg		negativa
33	2	33	85	925	317	negativa				neg		negativa
18	2	33	57	924	318	negativa				neg		negativa
66	2	33	78	696	319	positiva	1:256	pos	1:64			R. typh/prowa.
21	1	4	9	49	320	negativa	0	neg		neg		negativa
12	1	33	56	921	321	negativa	0	neg		neg		negativa
8	2	33	81	901	322	negativa				pos	1:64	R. prowazekii
32	1	33	76	677	323	positiva	1:128	neg				R. typhi.
41	1	33	70	614	324	positiva	1:256	neg				R. typhi.
26	1	33	70	612	325	negativa				neg		negativa
56	1	33	87	911	326	negativa				neg		negativa
44	1	33	93	995	327	negativa				neg		negativa
12	1	33	85	908	328	negativa				neg		negativa

39	1	33	58	302	329	negativa				neg		negativa
28	1	33	67	910	330	negativa				neg		negativa
35	1	33	55	907	331	negativa				neg		negativa
15	1	33	65	898	332	negativa				neg		negativa
24	2	33	79	726	333	negativa				neg		negativa
50	1	33	71	623	334	negativa				neg		negativa
55	1	4	16	55	335	negativa				neg		negativa
52	1	33	57	920	336	negativa				neg		negativa
21	1	33	65	914	337	negativa				neg		negativa
59	1	33	84	926	338	negativa				neg		negativa
30	1	33	70	613	339	negativa				neg		negativa
67	1	33	70	617	340	positiva		neg		neg		negativa
6	1	33	81	902	341	negativa				neg		negativa
27	1	4	23	215	342	negativa				neg		negativa
75	2	33	70	619	343	negativa				neg		negativa
62	1	33	70	616	344	negativa				neg		negativa
22	1	4	15	58	345	negativa				neg		negativa
57	1	33	55	930	346	negativa				neg		negativa
37	1	33	57	923	347	negativa				neg		negativa
32	1	33	55	912	348	negativa				neg		negativa
30	1	33	57	753	349	positiva	1:256	pos	1:64	neg		<i>R. typh/prowa.</i>

# RESUMEN BIOGRAFICO

AARON MEDINA SANCHEZ

Candidato Para El Grado De  
Doctor En Ciencias Con Acentuación En Entomología Médica

Tesis: **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *RICKETTSIA SP.* Y SUS  
POSIBLES ARTRÓPODOS VECTORES EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN Y  
VERACRUZ, MÉXICO**

**Campo de estudio:** Entomología Médica

**Datos personales:** Nacido en Guadalajara, Jalisco, el 22 de Abril de 1979, hijo del Dr. Sergio Antonio Medina Castillo y de Maria Irene Sanchez Vargas.

## **Educación:**

### **Licenciatura**

Ingeniero en Biotecnología egresado del Instituto Tecnológico de Sonora, de Ciudad Obregón, Sonora.

### **Estancia en el extranjero**

#### **University of Texas Medical Branch. Galveston, Texas.**

International Fogarty Grant Fellow, estancia doctoral en el departamento de patología, realizando trabajo de investigación en microbiología medica con enfoque a enfermedades rickettsiales con grandes logros en el área de la rickettsiologia, como la identificación de un agente microbiano nunca antes encontrado en el país. 2 publicaciones científicas, oportunidad de exponer estos trabajos en diferentes congresos internacionales realizando presentaciones orales y carteles, obteniendo premios como mejor trabajo para asistir a un congreso en España y Argentina.

## **Experiencia profesional:**

**Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,**

**Giro:** Investigación y Desarrollo

Puesto: Investigador del departamento de Biotecnología Médica y Farmacéutica

Fecha de Entrada: Junio 2011

### **Hospital Y Clínica OCA**

**Giro:** Diagnóstico molecular-Hospital

**Puesto:** Asistente de Investigación-Laboratorio de Medicina Molecular - 1 año

Fecha de entrada: marzo 2009

Fecha de salida: diciembre 2010

Encargado de Realizar diagnósticos moleculares en el Laboratorio de Medicina Molecular, incluyendo pruebas de paternidad y tipificación molecular de enfermedades infecciosas. Logros: Premio nacional de investigación por el diagnóstico molecular de influenza H1N1 en Monterrey, otorgado por el Colegio Nacional de Químicos.

### **University of Texas Medical Branch**

**Giro:** Educación e Investigación

**Puesto:** Investigador Visitante - 4 años

Fecha de entrada: noviembre 2003

Fecha de salida: diciembre 2007

Entre mis responsabilidades estuvo el entrenamiento de estudiantes de posgrado en el rubro de diagnóstico molecular y estudios serológicos para detección de rickettsiosis. Logrando mi certificación para trabajar en laboratorio de bioseguridad nivel 3, así como en el manejo de animales para investigación de enfermedades infecciosas

### **Participaciones en Conferencias:**

- 2010 Conferencia “Vectores de *Rickettsia* en el Noreste de México” invitado por el Colegio de profesionales de química clínica A.C. en la facultad de medicina de la U.A.N.L., **Monterrey, México**. 23 de Abril 2010
- 2009 Workshop presentation “The race for improving the diagnostic of influenza virus in Monterrey, Mexico.” in the Association for Molecular Pathology Association for Molecular Pathology 2009 Annual Meeting November 19-22, 2009, The Gaylord Palms Resort & Convention Center, **Kissimmee, FL**.
- 2008 Poster Session “Vertical Transmission of *Rickettsia prowazekii* in *Amblyomma imitator* naturally infected in the state of Nuevo Leon, Mexico.” In the VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, **Buenos Aires, Argentina**.
- 2007 Oral Presentation “Isolation of *Rickettsia amblyommii* and seroprevalence of *Rickettsia* in the state of Veracruz, Mexico.” American Society of Rickettsiology, **Colorado Springs, Colorado, USA**.

- 2006 Mesa redonda “*Rickettsia* in the north of Mexico, and the possible arthropod vectors” 14th Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária , 2<sup>nd</sup> Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. **Riberao Preto, Brasil**
- 2006 Oral Presentation “Detection of a typhus group rickettsia in *Amblyomma* sp. ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico” in the 72<sup>nd</sup> American Mosquito Control Association, **Detroit, Michigan, USA**
- 2006 Poster session. “Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the State of Nuevo Leon, Mexico.” Bugs, Drugs and Vaccines: Securing Our Future, **Galveston, Texas. USA**
- 2005 Oral Presentation “Discovery of a typhus group rickettsia in *Amblyomma* sp. ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico” In the 4<sup>th</sup> International Conference Rickettsiae And rickettsial disease, **Logroño, Spain**. Travel Awarded by the committee.
- 2005 Sesión de póster “Aislamiento de *Rickettsia prowazekii* en garrapatas del genero *Amblyomma* en el estado de Nuevo León” 3er Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Medicina Tropical. **Acapulco Guerrero, México**.
- 2005 Poster session, “Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* sp. ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico” The American Society for Microbiology Texas Branch Meeting, **Houston, Texas, USA**

#### **Reconocimientos:**

- 2010 Premio nacional de investigación, “Influenza A (H1N1) 2009, diagnostico en OCA Hospital.” X Congreso Nacional de Quimica Clinica y Medicina de Laboratorio” ExpoLab **Monterrey**.
- 2008 Travel Award. “Vertical Transmission of *Rickettsia prowazekii* in *Amblyomma imitator* naturally infected in the state of Nuevo Leon, Mexico.” In the VI International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, **Buenos Aires, Argentina**.
- 2005 Travel Award “Discovery of a typhus group rickettsia in *Amblyomma* sp. ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico” In the 4<sup>th</sup> International Conference Rickettsiae And rickettsial disease, **Logroño, España**

#### **Publicaciones:**

1. 2010 *Amblyomma imitator* ticks as vector of *Rickettsia rickettsia*, Mexico. Oliveira KA, Pinter A, **Medina-Sanchez A**, Boppana VD, Winkel SK, Saito TB, Saito TB, Shelite T, Blanton L, Popov V, Teel PD, Walker DH, Galvao MA, Mafra C, Bouyer DH. Emerg Infect Dis. 2010 Aug; 16(8):1282-4
2. 2008 Genotyping *Rickettsia prowazekii* isolates, Zhu Yong, **Medina-Sanchez A**. Bouyer D, Walker DH, Yu Xue-Jie,. Emerg Infect Dis. 2008 Aug;14(8): 1300-2.
3. 2005 Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico, **Medina-Sanchez A. et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1063: 327–332**