

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y MOLECULARES DE LAS RICKETTSIOSIS EN ZONAS DE FRONTERA PERUANA - AÑOS 2011- 2012

*Disertación presentada para obtención del Título de Magister en Ciencias en el área de
Salud Pública.*

por

Rosa Palacios Salvatierra

Orientadora: Dra. Fátima da Conceição Silva

Lima / Rio de Janeiro, 28 de Agosto de 2014



Esta disertación, intitulada

***ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS Y MOLECULARES DE LAS RICKETTSIOSIS EN
ZONAS DE FRONTERA PERUANA - AÑOS 2011- 2012***

presentada por

Rosa Palacios Salvatierra

Ha sido evaluada por la Banca Examinadora compuesta por los siguientes miembros:

Fátima da Conceição Silva (orientadora) – IOC – Fiocruz

Carla L.T Andrade – ENSP – Fiocruz

Raquel de Vasconcellos C. de Oliveira– INI-IPEC- Fiocruz

Claudia Maria Valeté Rosalino – INI-IPEC – Fiocruz

André Perissé – ENSP – Fiocruz

Disertación defendida y aprobada el 28 de agosto de 2014

RESUMEN

INTRODUCCION/JUSTIFICACION: Las rickettsiosis son enfermedades de zonas endémicas que tienen como condicionantes, factores socioeconómicos además de epidemiológicos. Resulta necesario abordar los aspectos determinantes de su presentación en nuestro país, en donde la información es escasa. El presente estudio describe algunos aspectos epidemiológicos relacionados e incursiona por primera vez en el Perú en intentos de caracterización de especies circulantes de rickettsias a partir de aislamientos de humanos y también de vectores procedentes de localidades fronterizas de los departamentos de Tacna, Tumbes, Loreto y Madre de Dios, colectados durante un estudio poblacional previo para detectar prevalencia.

OBJETIVOS: Describir algunos aspectos característicos, clínico-epidemiológicos y genómicos de la circulación de rickettsias durante los años 2011 y 2012 en localidades de 4 zonas de frontera del territorio peruano.

METODOS: Se analizaron datos clínicos y epidemiológicos de individuos de diversos grupos etarios, información almacenada en 1,657 fichas del estudio previo, el cual contó con aprobación por Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud (CEI-INS) y utilizó consentimiento informado. Se reactivaron y propagaron aislamientos obtenidos de humanos durante el estudio previo, requiriéndose múltiples pasajes para obtener una carga microbiana aceptable. También fueron usados macerados de vectores (pulgas y garrapatas), obtenidos al momento del estudio, a partir de perros y gatos, en las mismas localidades estudiadas. Se hizo extracción de ADN de los aislamientos y alternativamente de macerados de vectores, se corrieron pruebas PCR para los genes *htrA* y *gltA*. Luego se procedió a purificar los genomas para someterlos a secuenciamiento. Para la parte epidemiológica se evaluó proporciones.

RESULTADOS: En promedio para las cuatro regiones, 81.35 % de encuestados informó haber tenido contacto con artrópodos vectores potenciales y el 56.5 % con animales domésticos y peri domiciliarios. Los parámetros edad, sexo fueron semejantes al comparar individuos de los 4 departamentos; se evidenció predominio de regulares (62 %) a bajas (27 %) condiciones de vivienda y saneamiento. El 22.6 % de los individuos con aislamiento positivo, eran asintomáticos, el 45 % no febriles, resultando este hecho, no propicio para el estudio molecular por constituir una pobre carga microbiana. Se evidenciaron, en primera instancia, bandas tenues en las corridas PCR. Solo después de 9 a 10 pasajes de propagación se elevó la carga microbiana y actualmente se continúa con los procedimientos moleculares para las muestras humanas. Se tuvo mayor éxito empleando vectores epidemiológicamente relacionados a los aislamientos en propagación, los cuales dieron bandas específicas consistentes por PCR, siendo sometidas a secuenciamiento, encontrándose homología para la especie *Rickettsia felis* en vectores *Ctenocephalides canis* y *Rhipicephalus sanguinus*, lo cual concuerda con estudios previos realizados; además se encontró compatibilidad para dos especies, *Rickettsia sp.* y *Rickettsia endosimbionte*, esta última no reportada en Perú, lo cual amerita continuar con los estudios para verificar éstos hallazgos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS: Se incursiona por primera vez en el Perú en intentos de caracterización de especies circulantes de rickettsias a partir de aislamientos de humanos procedentes de localidades fronterizas. Cabe anotar que la estandarización, implementación, desarrollo y aplicación de técnicas biológicas y moleculares especializadas, con motivo de éste estudio es un aporte que fortalecerá la capacidad institucional y nacional para lograr un sistema de vigilancia eficaz de las rickettsiosis en territorio peruano, basada en procedimientos de laboratorio altamente eficaces, sensibles, específicos y de amplia accesibilidad, lo cual no sería posible si no se cuenta con la información necesaria acerca de las características biológicas, moleculares y epidemiológicas del agente infeccioso involucrado.

Palabras clave: rickettsiosis, Perú, epidemiología, caracterización molecular

ABSTRACT

INTRODUCTION / RATIONALE: The rickettsial diseases are present in areas with favorable conditions such as socioeconomic and epidemiological characteristics. It is necessary to address the determinants of presentation in our country, where information is scarce. This study aims to describe some related epidemiological aspects and attempts to characterize for the first time in Peru the circulating species of rickettsiae isolated from patients and also from vectors present in four departments: Tacna, Tumbes, Loreto and Madre de Dios, which were collected during previous population-based study to detect its prevalence.

OBJECTIVES:

Describe some characteristic, clinical-epidemiological and genomic aspects of the circulation of rickettsias during the years 2011 and 2012 in 4 border areas of Peru.

METHODS: We analyzed clinical and epidemiological data from 1,657 individuals of various age groups. The information was obtained from records stored in a previous study and past and present studies received approval by the Ethics Committee of the INS and used the same informed consent. In addition, reactivated and propagated isolates from humans and also vectors macerated, obtained during the previous study were used to perform DNA extraction and PCR tests for the *htrA* and *gltA* gene in order to proceed the genomic sequencing and identify the isolates.

RESULTS: On average for the four regions, 81.35 % of individuals reported contact with potential arthropod vectors, and 56.5 % of them with domestic and peri household animals. The parameters age, sex and others were similar when comparing individuals of the 4 departments; the prevalence of regular (62%) to low (27%), housing and sanitation conditions were evidenced. 22.6 % of the cases with positive microorganism isolation were asymptomatic individuals, 45 % of them nonfebrile, thus not being good source for molecular study since they usually have a poor microbial load. As consequence, when human isolates were studied, in the first instance, only faint bands were evident in the PCR. Only after 9 to 10 passages performed to spread the microbial load we could increase and continue the molecular methods for the human samples. In the order hand, we were able to perform a molecular sequencing of the vector analyzed. Sequence homology was found for *Rickettsia felis* isolated from *Ctenocephalides canis* and *Rhipicephalus sanguinus*; this result agrees with previous studies. In addition, we were also able to identify two species of rickettsias, i.e *Rickettsia sp* y *Rickettsia endosymbionte*, this latter not yet reported in Peru; which warrants us to continue the studies to verify these findings.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES: This is the first study in Peru which attempts to characterize circulating rickettsial species from human isolates from different regions of our country. It should be noted that standardization, development and implementation of specialized biological and molecular techniques, during this study is a contribution to strengthen the institutional and national capacity to achieve an effective surveillance of rickettsial diseases in Peruvian territory. Based on procedures highly effective, sensitive, specific and broad accessibility lab, which would not be possible if we do not have the necessary information about the biological, molecular and epidemiological characteristics of infectious agent involved.

Keywords: rickettsiosis, Peru, epidemiology, molecular characterization

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	8
2. ASPECTOS TEORICOS-CONCEPTUALES	12
2.1 Antecedentes de estudios epidemiológicos y moleculares sobre rickettsiosis en las Américas	12
2.2 El agente infeccioso	16
3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	20
4. OBJETIVOS	21
5. METODOS	22
5.1 Aspectos epidemiológicos	22
5.1.1 Material utilizado	22
5.1.2 Variables	24
5.2 Aspectos moleculares	24
5.2.1 Material utilizado	24
5.2.2 Técnicas empleadas	25
6. RESULTADOS	28
6.1 Análisis epidemiológico	28
6.2 Análisis molecular	35
7. DISCUSION	38
8. CONCLUSIONES	42
9. CONSIDERACIONES FINALES	44
10. REFERENCIAS	45
11. ANEXOS	51

Definiciones conceptuales

Rash maculopapular: erupción dérmica de coloración rosada, con formas pequeñas, planas (máculas) y pequeñas protuberancias hinchadas (pápulas).

Células Vero: línea celular continua de fibroblastos de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

Células C6/36: línea celular estable de glándulas salivales de mosquito *Aedes albopictus*.

Genoma: material hereditario, ARN o ADN.

Secuenciamiento: Procedimiento para obtención de secuencias nucleotídicas a partir de ADN.

Gen *htrA*: gen antigénico de 17-kDa

Gen *gltA*: gen de la enzima citrato sintetasa

Gen *ompA*: gen de la proteína A externa de membrana

Gen *ompB*: gen de la proteína B externa de membrana

Gen 23S *rRNA*: gen de la sub-unidad 23S del ribosoma bacteriano

HtrA: proteína codificada por el gen *htrA*

Abreviaturas

aa: aminoácido

ADN: Acido desoxiribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

pb: pares de bases

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Control y Prevención de Enfermedad de Atlanta-EEUU)

EEUU: Estados Unidos de Norteamérica

EMEM: Medio Esencial Mínimo con sales de Earle

FMB: fiebre maculosa brasileña

FMMR: fiebre manchada de las Montañas Rocosas

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

INI: Instituto Nacional de Infectología Evandro Chagas

IPEC: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

INS: Instituto Nacional de Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT: Transcripción reversa

SFGR: Spotted fever Group Rickettsia (Rickettsias del Grupo de las Fiebres Manchadas)

LISTADO DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Observación microscópica de las rickettsias

Figura 2: Dos vectores implicados en la transmisión de las rickettsiosis

Figura 3: Mapa del Perú y las cuatro regiones estudiadas

Figura 4: Corrida electroforética de la reactivación de 8 aislamientos, empleando primer htrA (17 kDa) de 434 pb, con controles positivo y negativo, en presencia de marcador molecular, evidenciando bandas muy tenues.

Figura 5: Observación microscópica (400X) de células Vero control e infectadas

Figura 6: Observación microscópica (400X) de inmunofluorescencia indirecta (IFI) a partir de los cultivos

Figura 7: Corrida electroforética del genoma de vectores empleando primer htrA (17 kDa) evidenciando bandas específicas bien marcadas

LISTADO DE TABLAS

Cuadro 1: Resumen de la metodología para la parte epidemiológica

Cuadro 2- Secuencias de primers usados para detección del ADN rickettsial

Cuadro 3: Distribución porcentual de las condiciones de vivienda en 1,657 fichas

Cuadro 4: Distribución porcentual de información sobre presencia de animales domésticos o peri domiciliarios y vectores potenciales en 1,657 fichas analizadas.

Cuadro 5: Distribución porcentual de positivos en serología y/o aislamiento de rickettsias

Cuadro 6: Confirmación del aislamiento de *Rickettsia* sp en el grupo estudiado

Cuadro 7: Distribución porcentual de la presencia de animales domésticos/peri domiciliarios y de vectores potenciales, viajes previos y condiciones de vivienda y saneamiento para los positivos .

Cuadro 8: Distribución de síntomas clínicos informados por los positivos

Cuadro 9: Frecuencia de síntomas clínicos informados por los 31 individuos con aislamiento positivo verificado por PCR para *Rickettsia* sp.

Cuadro 10: Resultados secuenciamiento de vectores

1. INTRODUCCION

Las bacterias aeróbicas del género *Rickettsia*, familia Rickettsiaceae, orden rickettsiales (1) pueden causar un grupo de infecciones denominadas genéricamente como rickettsiosis, las cuales son enfermedades febriles de carácter sistémico, que se desenvuelven dentro de una compleja dinámica que involucra características de vectores, hospederos y ambientes bióticos y abióticos, pudiendo afectar a personas de todas las edades, independientemente de su estado inmune. Los síntomas clínicos incluyen fiebre de establecimiento súbito o insidioso, severa cefalea y malestar general, aunque también con frecuencia desarrollan mialgia, náusea, vómito y fotofobia, a veces erupción maculopapular que progresivamente se generaliza (2).

No todas las rickettsiosis son igualmente severas, aun cuando sus mecanismos patogénicos son compartidos entre especies, esto se explica por diferencias en la virulencia de dichas especies y en factores relacionados con el vector. Varias especies del género *Rickettsia* (*R.*) son altamente patogénicas; por ejemplo *R. rickettsii*, el agente de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) y *R. prowazekii*, el agente del tifus epidémico.

La definición de la familia *Rickettsiaceae* está basada principalmente en caracteres fenotípicos no específicos, no obstante durante los últimos 20 años, el secuenciamiento de los genes y la filogenia genética han cuestionado profundamente ésta clasificación (1), habiéndose propuesto varios escenarios relacionados con la evolución de la patogénesis de las rickettsias, los cuales van desde la pérdida de genes conducente a virulencia hasta la adquisición de factores de virulencia, seguido por una modificación gradual hacia la simbiosis (3). Es probable que ningún escenario por si solo explique la evolución de la patogénesis para rickettsias, ya que han desarrollado estrategias de manipulación de hospederos múltiples para su supervivencia y la diversificación observada refleja una evolución reductiva que mantiene cambios en tamaño y composición genómica, permitiendo emerger nuevas características inter especies (4).

La distribución global de los patógenos rickettsiales varía de acuerdo a la densidad y distribución de los vectores predominantes y la densidad poblacional de los hospederos reservorios, manteniendo carácter endémico en diversas regiones del mundo. La expansión en las poblaciones de vectores puede introducir agentes rickettsiales hacia nuevas áreas geográficas (5). En general, las rickettsiosis son reconocidas como problema de salud para los viajeros (6). Se le considera problema sanitario de impacto en la población de diversas regiones del mundo a pesar de su relativamente baja prevalencia, con tasas de letalidad entre 25

y 62.5%, especialmente en personas infectadas sin tratamiento o cuando éste se inicia tardíamente y depende de la edad de los pacientes, oportunidad del tratamiento entre otros factores (7).

Las condiciones de vida de las poblaciones sin hogar en todo el mundo, tales como refugiados de conflictos bélicos, o víctimas de desastres naturales proveen condiciones propicias para la diseminación de los vectores responsables de la transmisión de éstas enfermedades (piojos, pulgas, garrapatas y ácaros), lo cual es frecuentemente subestimado (8, 9). En décadas recientes, los movimientos de poblaciones por las causas mencionadas o asociados con aumento en tamaño y densidad poblacional y pobreza persistente (barriadas peri-urbanas en expansión) llevan a condiciones anti-higiénicas y de hacinamiento y a la proliferación de vectores (8, 9, 10, 11). Se puede afirmar que los parámetros epidemiológicos sobre magnitud y vulnerabilidad basados en incidencia de enfermedades rickettsiales en América Latina no incluyen la participación de diversos aspectos a ser tomados en cuenta para evaluar riesgos ante estas enfermedades y su verdadera trascendencia (12).

Las rickettsias tienen la capacidad de retener funciones metabólicas a partir de las células hospederas procedentes de reservorios mamíferos y humanos, presentando una variabilidad natural que es considerada como la responsable de las diferencias relacionada a la severidad de las infecciones en humanos en comparación a la que se presentan en otros mamíferos (13, 14). Esta variabilidad en comportamiento biológico y la heterogeneidad observada en sus características moleculares, impiden establecer parámetros adecuados para su identificación y clasificación taxonómica, por lo que resulta necesario no solo su caracterización en aspectos biológicos, sino también en su estructura genético-molecular en relación con los perfiles clínicos y epidemiológicos que exhiben las infecciones rickettsiales (11).

El empleo de pruebas moleculares para vigilar la aparición de nuevas especies de Rickettsias ha proporcionado, en muchos países, valiosa información acerca de la distribución geográfica de las rickettsiosis y la asociación entre agente y vector, con miras a una mejor comprensión de la epidemiología de estas enfermedades a fin de contar con recomendaciones para su prevención y control (12, 15).

Para determinar la prevalencia y distribución de los patógenos rickettsiales alrededor del mundo, los científicos han confiado más y más en las técnicas moleculares adicionalmente a los

métodos serológicos y cultivos. La facilidad de empleo y sensibilidad/especificidad de las técnicas moleculares tales como la tipificación de secuencias multilocus han conducido a un incremento en los reportes de la detección e identificación de nuevas y viejas rickettsias en regiones endémicas nuevas y previamente conocidas (15).

La epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas integra los principios de la epidemiología y la biología molecular. La descripción contemporánea se enfoca en la contribución de los factores de riesgo genéticos y medioambientales, identificados a nivel molecular, a la etiología, distribución y prevención de enfermedad. En 1989, Balayeva fue la primera en usar el concepto de epidemiología molecular para las enfermedades rickettsiales. Ella, a fines de los 80, propuso usar los descubrimientos más recientes en laboratorio científico para investigar la epidemiología de las rickettsioses, pues percibió que los cambios en su incidencia y distribución geográfica serían aclarados al discriminar entre aislamientos bien conocidos y los nuevos aislamientos, basados en características genéticas y fenotípicas estandarizadas, y bases de datos referenciales validadas. Tales ideas y principios están actualmente en concordancia con las modernas aplicaciones de la epidemiología molecular. Han sido utilizadas para caracterizar la dinámica y transmisión de la enfermedad, la discriminación entre aislamientos diferentes e identificación de nuevos patógenos (16).

Actualmente muchos países llevan a cabo la investigación de nuevas especies de rickettsias empleando técnicas moleculares de avanzada dada la amplitud del perfil epidemiológico de éste grupo de enfermedades, que amerita alta sensibilidad y especificidad en procedimientos para estudiar la historia natural de especies patogénicas y la dinámica de la enfermedad en sus diversas presentaciones (17, 18, 19, 20).

Desde su creación e implementación, las técnicas moleculares han sido instrumentos muy útiles para estudios epidemiológicos sobre origen de brotes y distribución de subtipos de cepas. La experiencia indica que el empleo difundido de éstas técnicas en todo el mundo ha podido cambiar considerablemente las nociones y conceptos existentes acerca de la ecología, epidemiología y presentación clínica de muchas de las rickettsiosis (21).

También como consecuencia de su utilización durante los últimos 30 años se ha podido llegar al descubrimiento de más de 20 rickettsias recién reconocidas y se ha podido aclarar varias interrogantes epidemiológicas de larga data acerca de la heterogeneidad clínica y distribuciones

geográficas inusuales de muchas de las enfermedades rickettsiales históricamente reconocidas, elevando el reconocimiento global de las enfermedades rickettsiales y el impacto que estas infecciones tienen sobre una considerable proporción de la población mundial (15). En la actualidad, los códigos genéticos únicos para cada una de las especies, subespecies, y cepas de rickettsias provee del fundamento para el diagnóstico confirmatorio y epidemiología molecular de las rickettsiosis y representan la piedra angular del descubrimiento de estos patógenos. A continuación, algunos estudios precedentes de caracterización molecular para distintos escenarios en todo el mundo:

Algunos factores que determinan la dinámica de las rickettsiosis, como la competencia y capacidad vectorial, la ecología del vector, el espectro de hospedadores vertebrados que actúan como potenciales reservorios y/o amplificadores de las rickettsias, y la naturaleza de la relación vertebrado-rickettsia, han sido incluidos y analizados en trabajos recientes realizados en Sudamérica, particularmente en Brasil (22). En este sentido, los mayores avances se produjeron en el conocimiento de la ecología de *R. rickettsii*. En Argentina y Uruguay los estudios realizados tratan principalmente sobre ecología y detección de *R.parkeri* en el vector, la garrapata *A. triste*, pero a la fecha no se han realizado estudios eco epidemiológicos integrales (23, 24), lo cual se considera pertinente no solo para el Cono Sur, sino para toda Latinoamérica, a fin de incluir de manera integral las variables asociadas al agente, al vector, al hospedero vertebrado, y al ambiente donde estos organismos interactúan entre sí y con los seres humanos (25).

En el presente siglo, han sido descritas siete nuevas especies de Rickettsias que infectan garrapatas en Sud América (26). De éstas, con reciente descripción en humanos, está *R. felis*, cuyo vector conocido son las pulgas *Ctenocephalides spp.* Esta infección rickettsial fue confirmada en humanos por métodos moleculares (27), con subsiguiente detección molecular en el vector (28). Esta rickettsia está incluida en el grupo SFGR (29) y se ha confirmado que infecta garrapatas (30).

Para muchas de las rickettsiosis prevalentes en América Latina, al ser difíciles de diagnosticar, debido a la presentación clínica no-específica inicial que lleva a desorientación clínica y confusión diagnóstica con infecciones virales, se crea un problema crítico, pues de ser detectadas pueden tratarse oportunamente con antibióticos evitando resultados fatales (15).

2. ASPECTOS TEORICO-CONCEPTUALES

2.1 Antecedentes de estudios epidemiológicos y moleculares sobre rickettsiosis en las Américas

En general, se sabe poco acerca de la carga de enfermedad por afección rickettsial y sus ciclos de transmisión en muchas regiones tropicales del mundo, particularmente en Sud América (31). Probablemente la severidad de la enfermedad es mayor entre habitantes de estas regiones a consecuencia del acceso limitado a una adecuada infraestructura para el cuidado de la salud, incluyendo laboratorios de diagnóstico y tratamiento antibiótico (14). Las similares presentaciones clínicas y la distribución superpuesta del patógeno puede conducir a diagnóstico errado de las infecciones rickettsiales con virus dengue o leptospirosis, ocasionando sub notificaciones crónicas. La información disponible sugiere que la transmisión de algunas rickettsias es más prevalente que la reportada (22, 32).

A continuación, se incluye una breve revisión acerca de las rickettsiosis en la región americana: Muchas de las rickettsiosis en América Latina son enfermedades desatendidas al no ser regularmente incluidas en el diagnóstico diferencial con otras febriles (13), siendo la FMMR la más conocida. Dos tercios de los casos de FMMR, que ocurren en los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), se dan con mayor incidencia, en menores de 15 años, niños entre 5 y 9 años, con riesgo de complicaciones, y con 3% en mortalidad actualmente. Los casos suelen ser más frecuentes en primavera y verano cuando hay mayor actividad de vectores (33). Según datos del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta, la incidencia de FMMR incrementó significativamente en los últimos años.

Un devastador brote de fiebre manchada de las Montañas Rocosas que ocurrió durante 2008-2009 en Mexicali, México, compartió varias características epidemiológicas y entomológicas con un gran grupo de casos que se dieron varios años atrás en una comunidad Navajo al este de Arizona. Ambos eventos fueron desencadenados por una abundancia de perros libres callejeros y poblaciones masivas de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* en los ambientes peri domiciliarios. A consecuencia de las similitudes entre ambos brotes, reconocidos con 5 años de diferencia y separados por una distancia de aproximadamente 450 km, se emplearon ensayos de tipificación molecular para evaluar muestras de ADN de *R. rickettsii* obtenido de garrapatas y de pacientes enfermos en ambas localizaciones. Un análisis detallado de 3 regiones variables intergénicas, usado previamente para caracterizar todos los aislamientos conocidos de

R. rickettsii, dio los datos necesarios para determinar que los brotes de FMMR en Arizona y Mexicali fueron eventos independientes que involucraban cepas genéticamente diferentes de *R. rickettsii* (34).

En otro estudio, realizado en los Estados Unidos en el año 2010, fueron colectadas 198 garrapatas adultas en 4 localidades de la Costa del Golfo de la Florida y Mississippi; 28% de estas garrapatas estaban infectadas con *R. parkeri*, y 2% estaban infectadas con una nueva especie del grupo de las fiebres manchadas (SFGR). Diecisiete aislamientos de *R. parkeri* procedentes de muestras individuales fueron cultivadas en células *Vero E6*; sin éxito. Se realizó la caracterización genética parcial de la nueva especie SFGR revelando identidad con varias recientemente descritas, incompletamente caracterizadas, y no cultivadas SFGR, incluyendo a “*Candidatus Rickettsia andeanae*” y *Rickettsia* sp. Estos descubrimientos sugieren que cada una de estas “nuevas” rickettsias representaría las mismas especies (35).

Al sur de California (EEUU), en el año 2012, se llevó a cabo una evaluación medioambiental cuyos resultados condujeron al reconocimiento de un foco recientemente emergente de tifus murino, describiéndose una considerable infestación de la zarigüeya, *Didelphis virginiana Kerr*, con pulgas de gato, *Ctenocephalides felis*, en área suburbana. Se colectaron y analizaron muestras del reservorio animal y del vector en búsqueda de ADN bacteriano de dos agentes rickettsiales transmitidos por pulgas, *Rickettsia typhi* y *Rickettsia felis*. Esta última fue comúnmente detectada en pulgas colectadas en toda esta área, mientras que *R. typhi* fue encontrada a una prevalencia mucho menor en la vecindad de solo 7 de 14 casas de pacientes identificados. Se detectó ADN de *R. felis*, pero no de *R. typhi*, en tejido renal, hepático, y pulmonar de zarigüeyas. Por el contrario, no hubo ningún hallazgo hematológico por reacción en cadena de la polimerasa de *R. felis* o *R. typhi* en zarigüeyas, ratas, y gatos dentro del área endémica estudiada. Estos datos sugieren una probabilidad significativa de exposición humana a *R. felis* en el área estudiada; no obstante, la enfermedad causada por este agente no es reconocida por la comunidad médica, y puede ser equivocadamente diagnosticada como tifus murino empleando métodos serológicos no discriminatorios (36).

En Sonora (México), durante el último lustro se registró letalidad entre 8% y 17.8% con tendencia ascendente dada la condición de re emergencia de la enfermedad en especial en niños (7, 37).

En el año 2010, en dos distritos de San José, Costa Rica, fueron colectadas garrapatas adultas (*Amblyoma cajennense*) de caballos, y pulgas (*Ctenocephalides felis*) de perro, las cuales fueron individualmente procesadas para aislar rickettsias en cultivo celular. Lograron aislar en células *Vero*, Rickettsias a partir de garrapatas y en células *C6/36* a partir de pulgas. Los aislamientos a partir de garrapatas fueron identificados genotípicamente como *Rickettsia amblyommii*, y el aislamiento a partir de pulga fue identificado como *Rickettsia felis* mediante el secuenciamiento del ADN de porciones de los genes rickettsiales *gltA*, *ompA*, y *ompB* de cada uno de los aislamientos. Además se demostró presencia de ADN rickettsial en los especímenes no cultivados. Fueron secuenciados los productos amplificados de éstos especímenes y se demostró que también correspondían a *Rickettsia amblyommii*. Se encontró que en total, el 66.7% (10/15) de las garrapatas adultas *A. cajennense* estaban infectadas con rickettsias. Este es el primer reporte de un aislamiento exitoso en cultivo celular de *R. amblyommii* y *R. felis* en América Central (38).

Para Sudamérica, reportes de enfermedad humana asociada a rickettsias han estado limitados a casos esporádicos de enfermedad severa (fiebre manchada de las Montañas Rocosas y fiebre manchada brasilera) resultantes de infección por *R.rickettsii* transmitida por garrapatas en Brasil, Colombia, Argentina, México, entre otros países (39, 40, 41, 42, 43, 44). La enfermedad puede exhibir un alto rango en mortalidad, estimado en 20 % en ausencia de adecuado tratamiento antibiótico y aún en 5 % de pacientes que si recibieron antibiótico (45).

En Colombia, las enfermedades causadas por rickettsias fueron descritas por primera vez en el año de 1937, cuando se presentó un brote epidémico de un síndrome febril severo, el cual tuvo una letalidad del 95 % en el municipio de Tobia, Cundinamarca. En ese entonces, se identificaron bacterias compatibles con *Rickettsia sp* como el agente causal del síndrome, y a la forma clínica observada se le llamó fiebre de Tobia. En años recientes se presentaron tres brotes sucesivos de enfermedad por rickettsias en tres municipios al noroeste de Colombia. Estos se manifestaron como síndromes febriles acompañados de hipotensión, choque y falla respiratoria aguda y tuvieron una alta letalidad. En todos ellos se identificó mediante pruebas moleculares *R. rickettsii* como el agente causal de los casos fatales (42).

En el Brasil, en el período entre 1998 y 2010 fueron notificados 391 casos de fiebre maculosa brasileña (FMB), con un número máximo de 64 casos en el año 2009. Entre los múltiples factores implicados en la epidemiología de la FMB, influyen factores ecológicos y climáticos sobre el ciclo de vida de los vectores, hospederos y reservorios, lo que a su vez influye sobre la

distribución temporal-espacial de la enfermedad (22). Se reconoce que la gravedad de esta enfermedad y su creciente importancia en salud pública para este país, no es solo por la identificación de nuevos casos sino también el reconocer que la incidencia y distribución son mayores de lo que se imaginaba previamente (32).

Al sur de Brasil donde es común encontrar fiebre manchada causada por rickettsias, en el año 2013, un viajero que arribaba procedente de Portugal desarrolló un síndrome febril hemorrágico fatal diagnosticado como rickettsiosis de la fiebre manchada. Lograron aislar el agente, el cual fue identificado como *Rickettsia conorii conorii* al secuenciar genes rickettsiales (46).

En el Perú, durante los últimos 20 años ha ocurrido tifus epidémico ligado al piojo. Un brote de tifus epidémico ocurrió en Cusco, en dos comunidades rurales en 1985 (47). Desde 1989 hasta 1999, se da notificación de casos de tifus epidémico distribuidos en los departamentos de Ancash, Arequipa, Cuzco, Huánuco, Piura y Puno. Casi el 70% de los casos de tifus epidémico estuvo concentrado en dos provincias del Cusco, Quispicanchis y Paucartambo, con una población combinada de 120,000 personas (48).

Tres brotes de tifus fueron investigados entre Mayo de 1997 y Abril de 1998 en la provincia de Quispicanchis en el Cusco (49). Otras rickettsiosis fueron investigadas en Perú, como el tifus murino descrito en pacientes procedentes de la provincia de Huari, en el departamento de Ancash (50), y *Rickettsia felis*, identificada en *Ctenocephalides canis*, pulgas de animales domésticos, asociadas con casos sospechosos de tifus murino en hogares de los Andes Peruanos (51).

Existen reportes sobre circulación de rickettsiosis con distribución preferente en localidades con características favorables a la presencia de vectores (piojo del cuerpo, pulgas), y reservorios animales (roedores, perros, gatos, marsupiales, etc.), sin coberturas adecuadas de prevención por lejanía de las zonas en riesgo, localidades marginales, periféricas.

Estudios realizados (50, 52, 53, 54) han remarcado la evidencia serológica de infección en algunas localidades de los departamentos de Loreto, Huánuco, Cusco, Ancash, entre otras, tanto en pacientes asintomáticos o sintomáticos con cuadro febril indiferenciado. La vigilancia intensiva a nivel de regiones para casos clínicos de esta patología ha puesto de manifiesto la

importancia que tiene este grupo microbiano como agente etiológico de muchos cuadros febriles inespecíficos.

2.2 El agente infeccioso

Las bacterias del género *Rickettsia* pertenecientes a la familia Rickettsiaceae del orden rickettsiales (1), subdivisión alfa de la clase Proteobacteria (55), son intracelulares obligadas (56), Gram- negativas, pequeñas, aeróbicas, de forma cocoide, bacilar o pleomórficas, miden de 0.3 a 0.7 μm x 1.5 a 2.0 μm ; sin flagelos, aisladas, en pares, cadenas cortas o filamentos (figura 1).

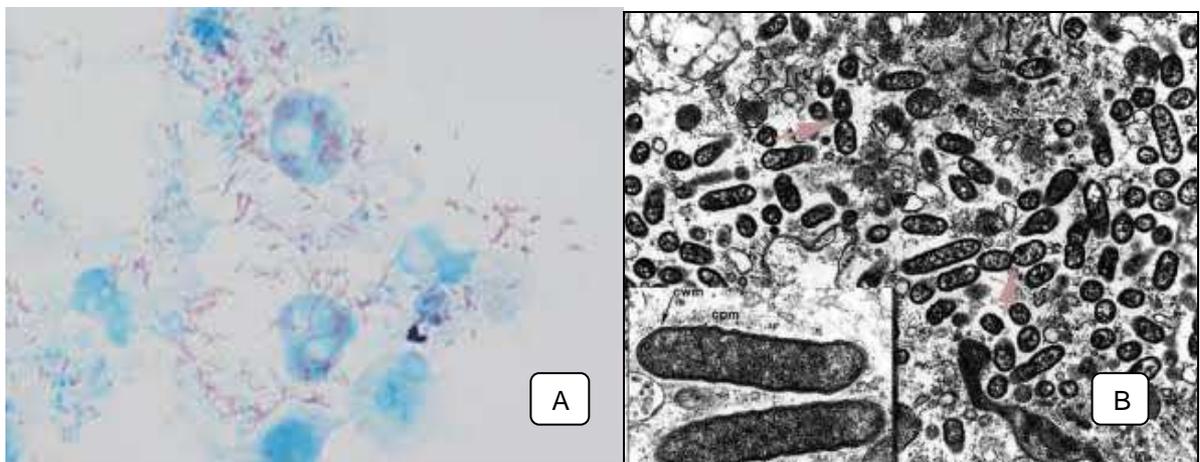


Figura 1: Observación microscópica de las rickettsias

A: Microscopía óptica de *Rickettsia conorii* observada en cultivo de células Vero a 1,000X.

Fuente: Rovey C, Brouqui P, Raoult D. *Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. Emerg Infect Dis 14(9), Sept 2008.*

B: Microscopia electrónica de *Rickettsia typhi* creciendo libre en el citoplasma de células cultivadas, en división por fisión binaria después de su liberación de los fagosomas.

Fuente: *American Society for Microbiology-MicrobeLibrary.org: Rickettsia, Obligately Intracellular Bacteria, Pathogenic for Humans, 2007.*

Se dividen por fisión binaria. Su genoma: DNA desde 1.1Mb (de la *R. prowazekii*) hasta 1.2 Mb (de la *R. conorii*). Setenta i seis por ciento del genoma codifica para 834 proteínas. Los genes con importancia diagnóstica son: 17kd, 16SRNA, citrato sintetasa, romp B, romp A

(57). Se han identificado numerosas especies en diversos artrópodos (11). Hay reportes recientes para anélidos hirudíneos y amebas (58).

Clásicamente, se ha clasificado a las rickettsias patógenas en dos grupos (1): grupo tifus (TG) conformado por *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*, cuyos vectores son los piojos (*Pediculus humanus*) y las pulgas, respectivamente y, grupo de las fiebres manchadas (SFG), compuesto por más de 20 especies, que tienen como vector a las garrapatas (59). Existen otras especies con características antigénicas y genéticas singulares, lo cual impide su inclusión en alguno de los dos grupos señalados (TG o SFG), ellas son: *Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*, reportadas en garrapatas del continente americano (3). Debido al descubrimiento de una variedad de nuevas especies en diversos artrópodos terrestres, la mayoría de vida libre y también por los análisis genéticos de plásmidos como el de *Rickettsia felis*, el género *Rickettsia* ha sido reclasificado en diferentes grupos: TG, SFG, grupo transicional (TRG), grupo bellii (BG), grupo canadensis (CG) y otros grupos básicos (60).

Producen infecciones sistémicas con compromiso prominente del endotelio vascular lo cual conduce a enfermedades de severidad variable, algunas de ellas potencialmente fatales como el tifus epidémico y la fiebre manchada de las montañas rocosas (34).

La clasificación de las rickettsias incluye al Grupo Tifus con sus representantes, el tifus exantemático, causado por *Rickettsia prowazekii*, conocido por su alta morbi-mortalidad durante brotes epidémicos (48) y el tifus murino, causado por *R. typhi* enfermedad zoonótica de distribución mundial, cuyo ciclo clásico de transmisión tiene como vector a la pulga de la rata *Xenopsylla cheopis* y como reservorios a roedores sinantrópicos: *Mus musculus*, *Rattus rattus* o *Rattus norvegicus* (61). Análisis moleculares han involucrado a la pulga del gato *Ctenocephalides felis* como vector (62) y la zarigüeya *Didelphys virginiana* como huésped de *R. typhi* (63). Otro Grupo de rickettsias, es el de las Fiebres Manchadas, que son transmitidas principalmente por garrapatas del grupo Ixodidae, ácaros o pulgas (figura 2), y agrupan a varias especies, entre las más comunes, y que pueden causar enfermedad en las Américas, están *Rickettsia rickettsi*, *R. akari*, *R. coonori* y *R. felis* (36, 61, 64).

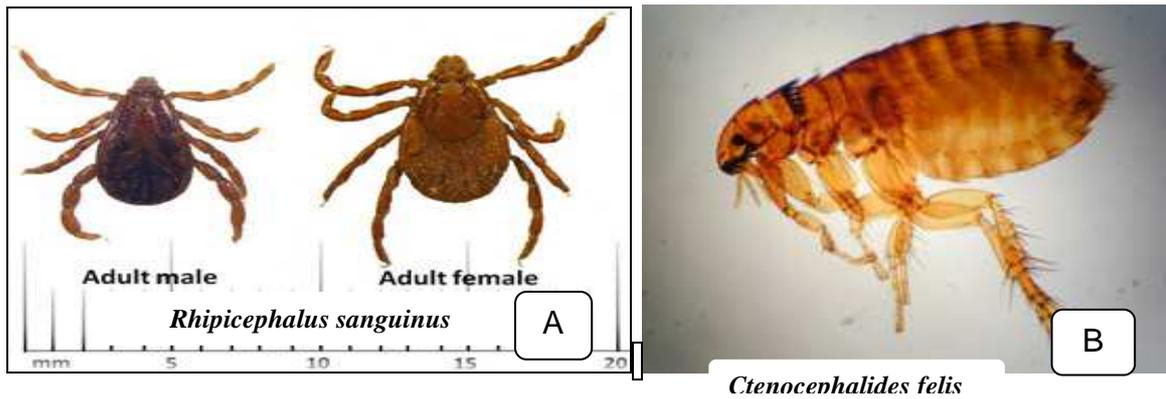


Figura 2: Dos vectores implicados en la transmisión de las rickettsiosis

- A) Garrapata del perro *Rhipicephalus sanguineus*. Fuente: *The TickApp for Texas and the Southern Region. The Texas A&M University System, 2011.*
- B) Pulga del gato *Ctenocephalides felis*. Fuente: *EDPA (Esame Diretto delle Polveri Ambientali) Collezione Urania Entomofauna del mondo SRL, 2010.*

Con relación a los métodos de diagnóstico molecular de las enfermedades rickettsiales en general, se han enfocado en la identificación de la lipoproteína de 17 kDa y de rOmpB, por técnicas inmunológicas (IFI) y moleculares (PCR). Para rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, la caracterización de especie se realiza por PCR y fragmentos de restricción polimórficos (RFLPs) de la proteína rOmpA (60).

El gen que expresa rOmpA ha sido identificado en casi todos los miembros del grupo de las fiebres manchadas (65). El análisis de la secuencia nucleotídica del gen rOmpA sugiere que es una proteína transmembrana, que consiste de varias regiones hidrofílicas que son externas a la bacteria. Presenta un peso molecular de 170 a 198 kDa, y una correlación genética que ha sido estimada revelando unidades de 72-75 aminoácidos codificados por una región repetida. Esta variabilidad genética entre especies de Rickettsias ha permitido su empleo como una herramienta útil en la caracterización molecular intra e inter especies (46). El gen de rOmpA de *R felis* codifica para una proteína de menor tamaño (60.5 kDa) y con un contenido de aminoácidos diferente a las regiones repetidas observadas en la proteína rOmpA de otras especies (66).

La proteína rOmpB tiene un peso molecular de 135 kDa, aunque siempre se ha referido a ella como una proteína de 120 kDa debido a su movilidad electroforética en su forma no desnaturalizada. Esta proteína de membrana es un componente de la capa superficial de la membrana, y a pesar de que el gen rOmpB pudiera codificar para una proteína de 168 kDa, existe evidencia que la proteína es modificada hasta generar una proteína de menor tamaño (135 kDa), observada por electroforesis. En contraste con el grupo de las fiebres manchadas, el grupo tifus expresa rOmpB pero no rOmpA (67). Dentro del grupo tifus, rOmpB es conocida como proteína antigénica de superficie y utilizada para diagnóstico por PCR, también se utiliza para la caracterización de especie. (38).

Con respecto al htrA es un gen que codifica para un dominio de serina proteasa activa en el periplasma de un amplio rango de bacterias y en eucariontes, su rol principal es degradar las proteínas mal ensambladas en el periplasma. Está asociada a la cubierta de la célula microbiana y es inducida por shock térmico (68). La proteína HtrA le confiere a la bacteria su virulencia, su capacidad de supervivencia dentro de macrófagos y su antigenicidad, pero al parecer no exhibe actividad de proteasa, teniendo limitados roles en comparación al que tiene en otras especies de bacteria, funcionando más como un chaperón molecular pues se sugiere que juega un rol en la traducción de señales (69).

El gen gltA codifica para la enzima citrato sintasa que cataliza el primer paso del ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo del ácido cítrico). Cataliza la reacción del oxalacetato y del acetil Coenzima A para formar citrato y coenzima A. Participa en la generación de una variedad de intermediarios celulares biosintéticos y en la generación de nucleótidos de purina reducidos que son usados en la generación de energía vía reacciones de fosforilación ligadas a transporte de electrones. (70).

Los genes para las subunidades ribosomales 16S y 23S son usados con propósitos taxonómicos para bacterias por ser altamente conservados, tienen también regiones variables según los microorganismos implicados y pueden aportar abundante información por su tamaño y por tener suficientes polimorfismos interespecíficos para dar medidas estadísticamente válidas y distinguibles. (71). No obstante, El gen 23S rRNA contiene más información filogenética que la contenida en las secuencias del 16S rRNA, y sus secuencias son mas divergentes en especies que han sido analizadas (72).

3. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Las enfermedades ocasionadas por las rickettsias aun constituyen, un grave problema sanitario con impacto a nivel mundial, dada su potencialidad para afectar amplios sectores de población, las dificultades para el diagnóstico y los desenlaces fatales cuando no son intervenidas a tiempo. Estos patógenos son responsables de muchos brotes alrededor del mundo causando serios cuadros clínicos, y en épocas no tan lejanas han causado muchas muertes humanas, por ejemplo, el tifus epidémico que afectó a millones de personas en Rusia y Polonia entre 1915 y 1922 (5).

El Perú cuenta con reportes sobre la circulación de rickettsiosis con distribución preferente en localidades con características favorables a la presencia de los vectores involucrados en la transmisión de estas enfermedades (piojos, pulgas, garrapatas), y diversos reservorios animales (roedores, perros, gatos, marsupiales, etc.), entre otros factores condicionantes para su presentación (localidades alejadas, marginales y empobrecidas). Según reportes del Instituto Nacional de Salud (INS- Perú), durante los años 2,009 al 2012, la positividad global para rickettsiosis fue del 10% al 27 % (73). Estudios realizados han remarcado la evidencia serológica de infección en algunas localidades de los departamentos de Tumbes, Piura, Junín, Ucayali, Arequipa, Puno, Cusco, Loreto, Madre de Dios y Tacna en pacientes asintomáticos o sintomáticos con cuadro febril indiferenciado (73).

El conocimiento profundo de este grupo de bacterias intracelulares en nuestro país, además de repercutir en el manejo clínico de los pacientes afectados y la prevención de la enfermedad para grupos en riesgo, tendrá consecuencias directas sobre la nueva generación de métodos de diagnóstico, facilitando el diseño de ensayos de rutina de bajo costo para estudios epidemiológicos de monitoreo sobre origen de brotes y distribución de subtipos de cepas que ampliaran los conceptos existentes acerca de la ecología, epidemiología y presentación clínica de muchas de las rickettsiosis (21). Se sabe que el estudio de ciertas características bacterianas explicitadas mediante análisis genómico, puede tener grande implicancia en la salud y el medioambiente (74), elevando el reconocimiento global de las enfermedades rickettsiales y el impacto que tienen sobre una considerable proporción de la población mundial. Los expertos en el tema consideran impostergable la caracterización de las rickettsias circulantes para nuestra región, identificación de especies involucradas y potencial patogenicidad (15).

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Describir algunos aspectos de las características clínico-epidemiológicas y genómicas de la circulación de rickettsias durante los años 2011 y 2012 en localidades de 4 zonas de frontera del territorio peruano.

Objetivos Específicos:

- Analizar los datos clínicos y epidemiológicos a rickettsiosis confirmados por serología y/o aislamiento procedentes de las regiones en estudio.
- Identificar especies de rickettsias circulantes en las regiones estudiadas y realizar el análisis filogenético de los aislamientos de Rickettsia y los vectores epidemiológicamente relacionados a estos.

5. METODOS

5.1 Aspectos epidemiológicos

5.1.1. Material utilizado

Se empleó el banco de datos de un estudio previo (75) para búsqueda de casos de rickettsias en zonas de frontera del Perú con características de interés epidemiológico. Para ésta parte del estudio se resumen las consideraciones metodológicas descritas en el Cuadro 1:

Cuadro 1: Resumen de la metodología para la parte epidemiológica

	TIPO DE ESTUDIO	POBLACION DE ESTUDIO	DISEÑO MUESTRAL	MUESTRA	UNIDAD DE MUESTREO	UNIDAD DE INFORMACION
Parte epidemiológica	Descriptivo transversal/ analítico	Banco de datos colectados mediante aplicación de ficha clínico epidemiológica durante estudio previo tipo encuesta (*) en localidades fronterizas de cuatro regiones del Perú: Tumbes, Tacna, Loreto y Madre de Dios	Fue estimado el tamaño de muestra en el estudio previo (*) con prevalencia de 50%, nivel de confianza 95%, error 5%, rechazo 15%. Seleccionados 380 sujetos en promedio por cada región, muestreo sistemático circular	Fichas clínico-epidemiológicas de 1,657 individuos encuestados durante estudio previo	Hogar que participó en la encuesta	Persona encuestada con datos completos en la ficha clínico-epidemiológica

Los criterios de inclusión fueron: contar con ficha clínico-epidemiológica con información completa de habitante de región fronteriza estudiada cuya muestra fue trabajada para detectar rickettsias, correspondiente a sujetos de cualquier edad o sexo, residentes en la zona, incluyendo aquellos a quienes les fue confirmado un caso de rickettsiosis por aislamiento y/o serología y como criterios de exclusión: aquellos con ficha clínico-epidemiológica sin datos suficientes. Cabe mencionar que en el estudio previo se excluyeron sujetos con enfermedad crónica terminal, inmuno-suprimidos, o con enfermedad psiquiátrica mayor (psicosis o esquizofrenia). Además fue excluida toda persona en tratamiento con antibióticos o que no hubiese firmado consentimiento ó asentimiento informado.

Las encuestas fueron llevadas a cabo en localidades fronterizas de cuatro departamentos de Perú: Tumbes, Tacna, Loreto y Madre de Dios (figura 3), que presentaban características epidemiológicas condicionantes (presencia de vectores, zonas empobrecidas, etc.). Se utilizó una ficha clínica-epidemiológica por persona entrevistada (anexo 1), haciendo un total de 1,657 fichas revisadas. El estudio previo mencionado fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud (CIEI-INS) del Perú con RD N° 498-2010-DG-OGITT-OPE/INS.

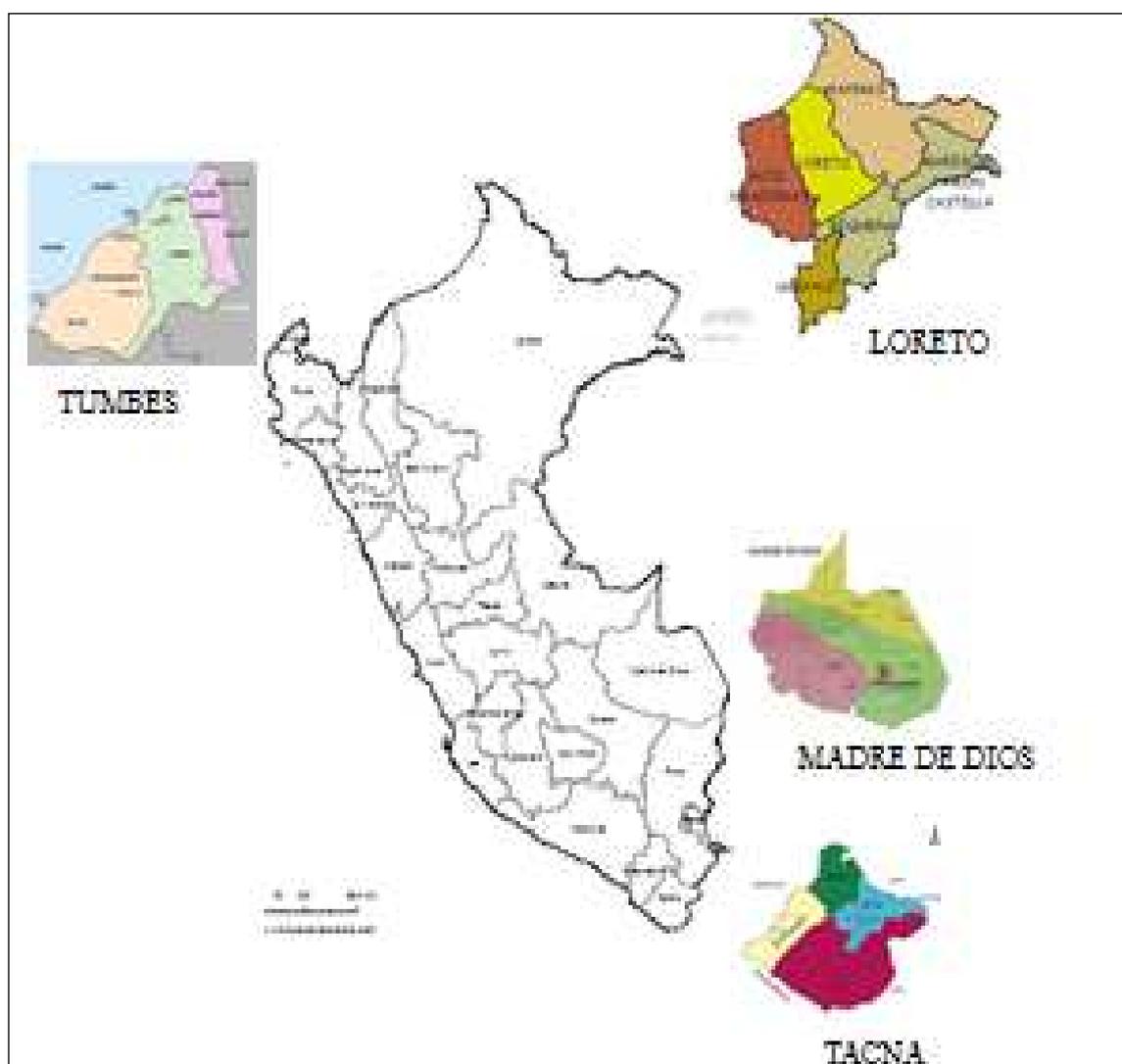


Figura 3: Mapa del Perú y las cuatro regiones estudiadas

Composición gráfica tomada de: IHMC Public CMaps. Mapas conceptuales

5.1.2. Variables

Fueron revisadas y analizadas todas las fichas clínico-epidemiológicas con información completa acerca de las variables consideradas de interés en la detección de rickettsias.

Las variables utilizadas en el presente estudio, fueron las siguientes: edad en años cumplidos, sexo como dos categorías correspondientes, masculina o femenina, procedencia, el lugar de residencia por un tiempo mínimo de dos años, actividad económica productiva principal, antecedentes de contacto con vectores y/o reservorios, tipo de vivienda o características físicas de la misma, saneamiento o disponibilidad de agua potable y alcantarillado, viajes previos realizados y sintomatología al momento de la obtención de la muestra: fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, malestar general, náusea, vómito, diarrea, palidez, congestión faríngea y erupción. Las condiciones de vivienda variaban en los cuatro departamentos, fueron calificadas como deficientes si es que no empleaban materiales nobles en su construcción y carecían de agua potable y desagüe; como regulares si es que contaban parcialmente con dichos materiales y servicios, y como buenas si eran construidas de material noble y contaban con agua y desagüe, hubo también un grupo sin información. Como variable interviniente se consideró la información sobre presencia o ausencia de anticuerpos contra *Rickettsia sp* al momento del estudio. Se efectuó un análisis descriptivo de las características clínico-epidemiológicas de los casos positivos comparativamente a los datos de la muestra poblacional total. Fueron verificadas las frecuencias relativas de las variables cualitativas (resultados de serología y resultados de aislamiento por región geográfica), empleando método estadístico con agrupamientos discretos y evaluando proporciones. Los datos cualitativos fueron expresados como frecuencias relativas (porcentajes). Se realizó un análisis exploratorio para determinar la distribución de frecuencias (medidas de tendencia central y de dispersión para variables cuantitativas. Todos La información fue ingresada a una base de datos en hoja de cálculo en Excel y luego procesados y analizados por programa EPI-INFO, realizando la descripción de las características mediante elaboración de tablas de frecuencia absolutas y porcentuales, hallando previamente la media de los valores ponderados para cada una de las variables estudiadas.

5.2 Aspectos moleculares

5.2.1 Material utilizado

Fueron empleadas muestras de sangre humano con resultado positivo para aislamiento en cultivo celular, confirmadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de

rickettsias, con o sin cuadro clínico; 31 aislamientos procedentes de las cuatro regiones estudiadas: 1 de Loreto, 3 de Madre de Dios, 15 de Tacna y 12 de Tumbes. Asimismo, se utilizó muestras de vectores que fueron colectados al momento del estudio junto con las muestras de humanos. Fueron procesados un total de 179 vectores: 43 de Madre de Dios (41 *Ctenocephalides felis* y 2 *Rhipicephalus sanguineus* de perros y gatos), 13 de Loreto (12 *Ct. felis* y 1 *R.sanguineus* de gatos y perros), 46 de Tacna (24 *Ct.felis* y 22 *R.sanguineus* de gatos, perros y ratas), 77 de Tumbes (46 *R.sanguineus* y 31 *Ct.felis* de perros, gato y rata). Las muestras de vectores de Tumbes quedaron pendientes de ser secuenciadas por dificultades logísticas (insuficientes reactivos entre otros) y serán motivo de estudios posteriores.

5.2.2 Técnicas empleadas:

Del total de muestras del estudio previo trabajadas para aislamiento de rickettsias: 410 muestras de Loreto, 412 de Madre de Dios, 401 de Tacna y 434 de Tumbes, fueron criopreservados en cepateca los cultivos que dieron positivo para aislamiento en cultivo: 4 de Loreto, 14 de Madre de Dios, 40 de Tacna y 34 de Tumbes; todos los cuales fueron procesados para reactivación, logrando recuperar en pasajes sucesivos y confirmar por PCR: 1 de Loreto, 3 de Madre de Dios, 14 de Tacna y 13 de Tumbes, en total 31 aislamientos de rickettsias a partir de muestras humanas, mantenidos a -80°C en solución de sucrosa fosfato glutamato (SPG). Las reactivaciones y propagación fueron llevadas a cabo en línea celular *Vero ATCC CRL-1586* (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), de bajo pasaje, la misma en la que fueron aislados, empleando Medio Eagle con sales de Earle suplementado con L-Glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y suero bovino fetal al 5 % (Gibco Invitrogen Corp. N.Y. EEUU) e incubándolos a 34°C en presencia de 5 % de CO_2 para cultivos desarrollados en frascos venteados (con filtro en las tapas)- (Falcon Becton Dickinson N.J. EEUU) y sin CO_2 para cultivos en shell viales con tapones de silicona y frascos sin filtro de ventilación en las tapas (Falcon Becton Dickinson). Fueron excluidos los contaminados y no confirmados. Después de 15 a 20 días de incubación máxima, se comprobó la viabilidad de los aislamientos mediante prueba IFI (76) a partir de las cosechas y se procedió a la extracción del material genómico (anexo 2).

Para los vectores, se realizó un macerado en pool de 2 hasta 12 vectores por cada muestra, de acuerdo al número colectado en la encuesta previa, por trituración en buffer de lisis 1X y proteinasa K (10 ug/ml) (anexo 3). Para la extracción del ADN a partir de ambos tipos de

muestras, se empleó el kit Pure Link Genomic DNA (Invitrogen Life technologies CA, EEUU). Luego se llevó a cabo una reacción estándar en cadena de la polimerasa (PCR convencional) usando el kit Taq Platinum DNA polimerasa (Invitrogen Life technologies, SP, Brasil), de acuerdo al protocolo establecido (anexo 4).

La identificación preliminar fue determinada mediante el gen del antígeno común de 17 kDaltons (htrA) (77, 78), después se confirmó con pares de nucleótidos de secuencia homóloga para htrA y se corrió adicionalmente para gltA, empleándose los iniciadores de reacción amplificante descritos en el cuadro 2. Habiéndose programado también la utilización de primers para los siguientes genes: ompA, ompB (79), y 23S rRNA (80), no se logró concretar su aplicación por los motivos ya mencionados.

Los fragmentos de ADN previamente amplificados por PCR fueron purificados mediante el Kit Pure Link Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo (Invitrogen Life Technologies), y directamente secuenciados, en ambas hebras, utilizando el Kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), previa cuantificación en espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific EEUU). La reacción de secuenciamento fue realizada en termociclador “GeneAmp PCR System 9600” (Applied Biosystems, CA, EEUU) siguiendo protocolos establecidos (Laboratorio de Biología Molecular de Biomedicina-Instituto Nacional de Salud y comunicación personal de la Dra. Elba de Lemos del FioCruz, Brasil), en cuanto a los tiempos y temperatura de incubación inicial y los ciclos a ser realizados subsiguientemente (anexo 5). Después de esta etapa, los productos del secuenciamento fueron purificados por precipitación en isopropanol (Merck Darmstadt, Alemania) al 75% de concentración final, con incubación por 15 min a temperatura ambiente, seguida de centrifugación a 12.000 g por 10 min. El precipitado fue lavado una vez en etanol absoluto (Merck EMSURE, ACS, ISO) al 75% y centrifugado en las mismas condiciones ya descritas. El sobrenadante fue retirado y el precipitado fue secado y re suspendido en 10 µL de solución de formamida ultrapura redestilada (Invitrogene Life Technologies), calentado a 90° C por 3 min y sometido a secuenciamento por electroforesis capilar en analizador genético automatizado (Applied Biosystem, modelo 3500xL Hitachi, Tokio, Japón) por un período de 12 horas. La visualización de los resultados fue realizada mediante el programa Bioedit evidenciándose electroferogramas (gráficos de las secuencias obtenidas como consecuencia de la electroforesis capilar).

GEN	PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO DE PRODUCTO (PB)	REFERENCIA	
htrA	17 KDa-2F:	5'- GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3'	434 pb	Jiang J. et al, 2005	
	17 kDa-2R	5'-CAT TGT TCG TCA GGT TGG CG-3'			
gltA	glt AF	5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3	382 pb		
	glt AR	5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3',			
ompA	ompAF	5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3`	590 pb		Blair PJ et al, 2004
	ompAR	5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3			
ompB	ompBF	5'-CCGTAACATTAAACAAACAAGCTG-3	2,478 pb		
	ompBR	5'-AGAGTACCTTGATGTGCRGTATAYT-3			
23S	23SF	5'-CTAAAGCAGAAGGAAAAATT-3`	530 pb	Hunt DE y col, 2006	
	23SR	5'-GCTTCTAGTGCCAAGGCATC-3			

CUADRO 2: Secuencias de primers usados para detección del ADN rickettsial

6. RESULTADOS

6.1 Análisis epidemiológico

Fue analizada parte de la información almacenada en 1,657 fichas clínico-epidemiológicas de individuos residentes en localidades fronterizas de cuatro departamentos del Perú: Tacna (401 fichas), Tumbes (434 fichas), Loreto (410 fichas) y Madre de Dios (412 fichas). Las edades variaban de 1 a 89 años (Mediana: 32): Tacna 1 a 73 años, Me: 30, Tumbes 1 a 84 (Me: 32), Loreto 5 a 89 (Me: 35) y Madre de Dios 1 a 75 años (Me: 31).

La distribución total para género fue del 66 % para el sexo femenino (Tacna 68 %, Tumbes 71 %, Loreto 58 % y Madre de Dios 67 %). la actividad económica productiva preponderante era la agricultura, pero no fueron establecidos los porcentajes por una alta ausencia de este dato en las fichas. La distribución porcentual para condiciones de vivienda por departamento se explica en el Cuadro 3 y denota una mayor proporcionalidad para condiciones regulares en las cuatro regiones estudiadas, y una distribución en general baja para buenas condiciones.

	Deficiente	Regular	Buena
TOTAL	454 (27.39 %)	1,026 (61.9 %)	174 (10.5 %)
Tacna	85 (21.2 %)	288 (71.82 %)	28 (6.98 %)
Tumbes (*)	181 (41.7 %)	217 (50.7 %)	33 (7.6 %)
Loreto	98 (24 %)	302 (73.6 %)	10 (2.40 %)
Madre de Dios	90 (20%)	219 (53 %)	103 (25 %)

CUADRO 3: Distribución porcentual de las condiciones de vivienda en 1,657 fichas

() Tres fichas carecen de ésta información*

La mayoría de individuos encuestados informó haber tenido contacto con animales domésticos y peri-domiciliarios, y con artrópodos vectores potenciales. También hubo información acerca de una mayor presencia de vectores con relación a años anteriores, para cada una de las áreas estudiadas. La distribución de estos eventos se muestra en el Cuadro 4.

	% de presencia intra o peri domiciliaria de animales ⁽¹⁾	Vectores ⁽²⁾	
		% contacto previo	% mayor presencia (3)
Total	56.5	81.35	25.58
Tacna	58.0	89.52	13.46
Tumbes	64.0	57.83	22.35
Loreto	40.5	91.46	45.60
Madre de Dios	63.6	88.10	20.87

CUADRO 4: Distribución porcentual de información sobre presencia de animales domésticos o peri domiciliarios y vectores potenciales en 1,657 fichas analizadas.

- (1) perro, gato, rata, pericote, otros: aves de corral, ganado vacuno, equino, porcino, mono.
- (2) pulgas, garrapatas, piojos.
- (3) mayor presencia de vectores con relación a los años anteriores.

La información disponible sobre estudios serológicos y aislamiento en cultivo celular a partir de las muestras obtenidas durante el estudio previo, exhibió para el total de 1,657 individuos muestreados, un 33.25 % (551) en positivos para serología, con títulos que variaban desde 1/64, 1/128 hasta 1/256 tanto para anticuerpos totales (IgA+IgM+IgG) como solo para IgG; en tanto el porcentaje de aislamientos a partir de sangre total periférica fue del 5.6 %, con 92 aislamientos (Cuadro 5). Hubo concomitancia en resultados positivos en algunos casos.

	% positivos serología	% positivos aislamiento	% concomitancia de serología e aislamientos	
			Para todas las muestras (1,657)	Para aislamientos positivos verificados (31)
Total	33.25	5.60	0.78	16.3
Tacna	46.13	9.97	9.75	25.0
Tumbes	32.48	7.83	5.71	14.7
Loreto	21.70	0.97	0	0
Madre de Dios	33.00	3.39	1.78	33.3

CUADRO 5: Distribución porcentual de positivos en serología y/o aislamiento de rickettsias

Los 92 aislamientos primarios obtenidos, verificados por inmunofluorescencia indirecta (IFI), fueron subcultivados con propósitos de propagación, no obstante en un porcentaje de 54.34 % no desarrollaron o se contaminaron, habiéndose recuperado únicamente en 45.65 % de los casos, a partir de lo cual fueron confirmados por prueba de la polimerasa en cadena (PCR) el 73.8 % (Cuadro 6).

	Aislamiento primario	Crecimiento secundario	Confirmación por PCR	% de confirmación
Total	92	42	31	33.69
Tacna	40	18	15	37.50
Tumbes	34	12	12	35.29
Loreto	4	1	1	25.00
Madre de Dios	14	11	3	21.42

Cuadro 6: Confirmación del aislamiento de *Rickettsia sp* en el grupo estudiado

De los 31 verificados por PCR, 16 (51.61 %) coincidieron en positividad para aislamiento y serología, quedando el 48.38 % solo con aislamiento positivo. Dado el pequeño número de casos positivos confirmados por PCR y la heterogeneidad en la distribución por Departamentos, todos ellos han sido evaluados en conjunto y no por Departamento. La edad promedio para éste grupo varió de 7 a 77 años (en promedio 37 años \pm 16.9 en desviación estándar, Me: 34). El 71 % eran mujeres.

Se detalla a continuación la información sobre presencia de animales domésticos o peridomiciliarios y vectores potenciales entre otros datos epidemiológicos. De acuerdo a ello, el 80.64 % (25) de los positivos confirmados tuvo contacto previo con vectores y reservorios, de los restantes se carece de información. Con relación a la probable mayor presencia de vectores en las zonas de procedencia del grupo de positivos confirmados, solo fue cierta en el 16 % (5) de los casos; en el 25.8 % (8) no se obtuvo esta información y la mayoría, 54.83 (17) informó disminución de la presencia de vectores en su zona (Cuadro 7).

Para analizar las condiciones de vivienda y saneamiento para éste grupo de positivos, se consideró los mismos criterios aceptados para la calificación del grupo general en: deficiente (vivienda precaria, piso de tierra, sin servicio de agua y/o desagüe), regular (viviendas no precarias, con piso de cemento y con servicio de agua y/o desagüe entubado), y buena (viviendas de material noble, servicio completo de agua y desagüe); habiéndose encontrado un 36.67 % deficientes, 33.33 % regulares y 30 % buenas.

	PRUEBA DIAGNOSTICA			DATOS EPIDEMIOLOGICOS				
	Serología	Aislamiento	PCR	CONTACTO PREVIO CON VECTORES Y/O RESERVORIOS (1)	PRESENCIA DE VECTORES EN EL DOMICILIO O PROXIMIDADES CON RELACION A LOS ANOS ANTERIORES (2)	PRESENCIA DE ANIMALES EN CASA (3)	VIAJE PREVIO	CONDICIONES DE VIVIENDA Y SANEAMIENTO
1	-	+	+	SI	++/++	SI	SI (Piura)	+/+++ (4)
2	-	+	+	SI	++/++	SI	No	++/+++
3	-	+	+	SI	++/++	SI	Si (Cusco)	+/+++
4	+	+	+	SI	+/++	SI		+/+++
5	-	+	+	SI	+/++	-		++/+++
6	+	+	+	SI	0/++	-		+/+++
7	-	+	+	SI	+/++	-		+++/+++
8	+	+	+	SI	-	SI		++/+++
9	+	+	+	SI	+/++	SI		+/+++
10	+	+	+	SI	+/++	SI		+++/+++
11	+	+	+	SI	+/++	SI		+++/+++
12	+	+	+	SI	+/++	SI		+++/+++
13	+	+	+	-	+/++	SI	Si, Ilo-Moquegua)	+++/+++
14	-	+	+	SI	-	SI		+++/+++
15	-	+	+	-	-	SI		+++/+++
16	-	+	+	SI	++/++	-		+/+++
17	+	+	+	-	-	-		-
18	+	+	+	-	+/++	-		+++/+++
19	+	+	+	SI	+/++	SI		+++/+++
20	-	+	+	SI	-	SI		+/+++
21	-	+	+	-	+/++	SI		+/+++
22	+	+	+	SI	-	SI		+/+++
23	-	+	+	-	+/++	-	Si (capital de Tumbes)	+/+++
24	-	+	+	SI	+/++	SI		++/+++
25	+	+	+	SI	-	SI		+/+++
26	-	+	+	SI	++/++	SI	Si, (Piura)	++/+++
27	-	+	+	SI	+/++	SI		++/+++
28	+	+	+	SI	+/++	SI		++/+++
29	+	+	+	SI	-	SI		++/+++
30	+	+	+	SI	+/++	SI		++/+++
31	-	+	+	SI	+/++	SI		++/+++

Cuadro 7: Distribución porcentual de la presencia de animales domésticos/peri domiciliarios y de vectores potenciales, viajes previos y condiciones de vivienda y saneamiento para los positivos

- (1) Perro, gato, pericote, rata, pulga, garrapata (-) ausencia o no informado
- (2) pulga, garrapata
- (3) perro, gato, perricote
- : ausencia de vetores / animales o no informado.
- + : Menor presencia de vectores / animales
- ++ : Mayor presencia de vectores / animales

(4) - : peores condiciones de vivienda y saneamiento; ++: regulares condiciones; +++ mejores condiciones

En todos los casos de positivos por aislamiento y confirmados por PCR (con serología positiva o sin ella) fue verificada la información de una variedad de síntomas presentes que no necesariamente serían atribuibles a infección por *Rickettsia sp.* El 22.58 % de individuos fueron asintomáticos, en tanto la mayoría presentaba al menos uno de los síntomas (Cuadros 8 y 9).

	PRUEBA DIAGNOSTICA			SINTOMAS											Número total de síntomas por individuo
	Serología	Aislamiento	PCR	Fiebre Escalofrío	Cefalea	Malestar general	Mialgia Artralgia	Erupción	Postración	Dolor retro ocular	Dolor abdomen	Nausea Vomito	Diarrea	Congestión nasofaríngea Tos	
1	-	+	+	si	si	si	si			si	si			si	7
2	-	+	+	si	si	si	si			si	si				6
3	-	+	+												0
4	+	+	+												0
5	-	+	+	si	si	si	si				si	Si	si		7
6	+	+	+	si	si	si				si	si	Si	si	si	8
7	-	+	+	si	si	si	si	si			si			si	7
8	+	+	+								si			si	2
9	+	+	+												0
10	+	+	+												0
11	+	+	+		si	si	si		si		si			si	6
12	+	+	+												0
13	+	+	+											si	1
14	-	+	+	si	si		si								3
15	-	+	+		si					si	si				3
16	-	+	+		si		si			si				si	4
17	+	+	+	si											1
18	+	+	+	si	si								si		3
19	+	+	+	si	si	si	si							si	5
20	-	+	+	si	si	si						Si			4
21	-	+	+		si										1
22	+	+	+												0
23	-	+	+			si								si	2
24	-	+	+	si		si	si		si				si	si	6
25	+	+	+		si	si									2
26	-	+	+		si		si		si		si				4
27	-	+	+				si								1
28	+	+	+											si	1
29	+	+	+										si		1
30	+	+	+			si									1
31	-	+	+												0
Total	16	31	31	11	15	12	11	1	3	5	9	3	5	11	
%	51,6	100	100	35,5	48,4	38,7	35,4	3,2	9,7	16,1	29,0	9,7	16,1	35,4	

Cuadro 8: Distribución de síntomas clínicos informados por los positivos

El síntoma más frecuentemente informado fue cefalea (48,39% de los casos), seguido de malestar general (38,71%), fiebre y escalofríos, mialgia/ artralgia y congestión de nasofaringe (cada uno presente en 11 de los casos (35,48%). En el cuadro 9 se presentan los datos referentes al número de síntomas informados por los individuos.

Numero de síntomas	Cantidad de individuos	Porcentaje sobre el total de 31 casos
Sin síntomas	7	22,58
1 síntoma	7	22,58
2 síntomas	3	9,68
3 síntomas	3	9,68
4 síntomas	3	9,68
5 síntomas	1	3,22
6 síntomas	3	9,68
7 síntomas	3	9,68
8 síntomas	1	3,22

Cuadro 9: Frecuencia de síntomas clínicos informados por los 31 individuos con aislamiento positivo verificado por PCR para *Rickettsia sp.*

6.2. Análisis molecular

De los 31 aislamientos de humanos, solo 12 verificaron por IFI en segundo pasaje y 8 por PCR con bandas tenues (Figura 4).

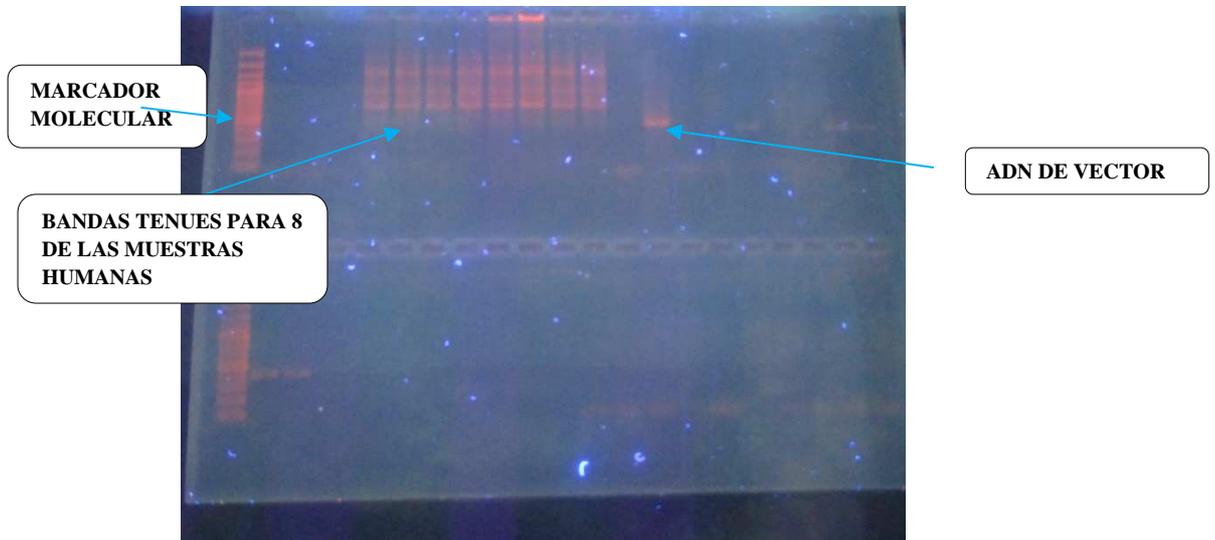


Figura 4: Corrida electroforética de la reactivación de 8 aislamientos, empleando primer htrA (17 kDa) de 434 pb, con controles positivo y negativo, en presencia de marcador molecular, evidenciando bandas muy tenues.

En primera instancia, no se pudo obtener suficiente carga microbiana para realizar el secuenciamiento molecular, a pesar de haberse propagado en tercer y cuarto pasaje, la mayor parte (23) de los aislamientos fueron perdiendo su nivel de evidencia para las corridas PCR que sucesivamente se realizaban después de las cosechas de los cultivos incubados que exhibían signos de efecto citopático (Figura 5).

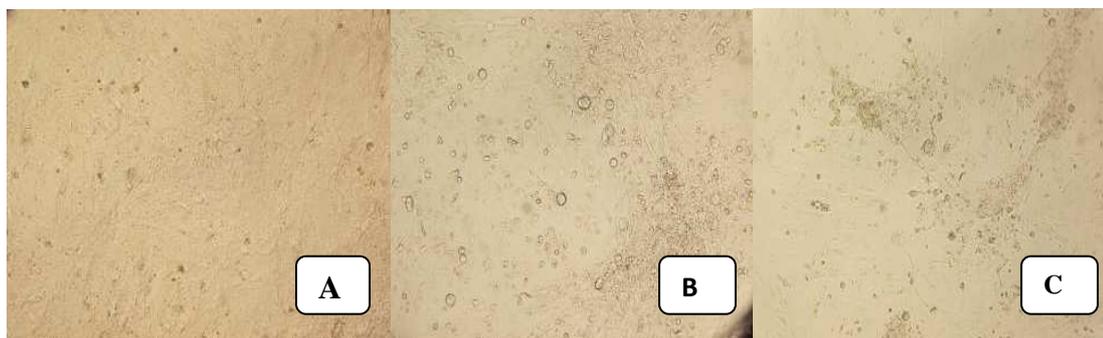


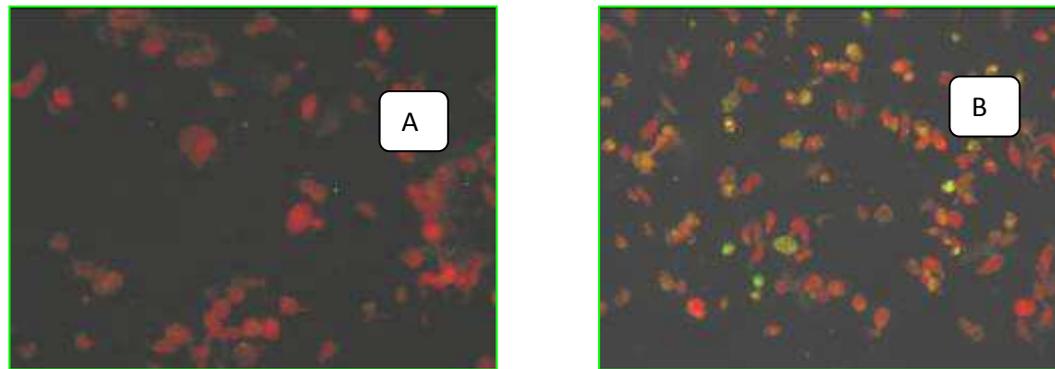
Figura 5: Observación microscópica (400X) de células Vero control e infectadas

A: Control de células Vero

B: Células Vero infectadas, efecto citopático incipiente;

C: Células Vero infectadas, efecto citopático avanzado

La verificación por IFI (figura 6) en algunos casos resulto inespecífica y las bandas en el PCR, aunque en el rango correspondiente al peso molecular del gen *htrA* de 17 kDa, fueron demasiado tenues (figura 4), lo cual inviabilizo una buena recuperación durante la purificación previa, habiéndose realizado de todos modos el secuenciamiento. Incluimos en la corrida, muestras de ADN de vectores capturados en las zonas muestreadas al momento del estudio, los cuales resultaron positivos fuertes, y fueron verificados para el gen *gltA*, empleándoseles luego como controles de sistema (figura 7).



A: Cultivo de células Vero control.

B: Cultivo de células Vero infectadas

Figura 6: Observación microscópica (400X) de IFI a partir de los cultivos

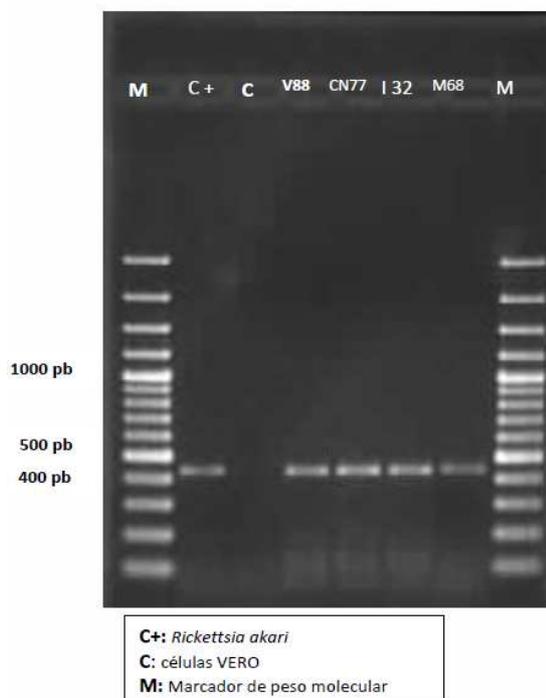


Figura 7: Corrida electroforética del genoma de vectores empleando primer *htrA* (17 kDa) , evidenciando bandas específicas bien marcadas

Con el resultado positivo lo suficientemente fuerte para 11 vectores procedentes de 3 de las 4 regiones estudiadas (1 de Madre de Dios, 6 de Loreto y 4 de Tacna), fue posible realizar el secuenciamiento molecular para la identificación de las rickettsias presentes en muestras de pulgas e garrapatas (Tabla 10). Identificándose 5 de ellos (45,45%) como *Rickettsia felis* y los demás (54,56%) como *Rickettsia sp* y/o *Rickettsia. endosimbionte* (Cuadro 11). Esta última especie aún no reportada en territorio peruano.

Se continúa con los procesamientos moleculares para la evaluación de más vectores y para verificar adicionalmente la identidad de los aislamientos obtenidos a partir de individuos sintomáticos y/o asintomáticos.

N° LAB	PROCEDENCIA	ESPECIE DE VECTOR	RESERVORIO	SECUENCIA COMPATIBLE CON:
J-61	La Joya-Madre de Dios	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Perro	<i>Rickettsia endosimbionte</i> y/o <i>Rickettsia sp.</i>
I-04	Indiana-Loreto	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	<i>Rickettsia endosimbionte</i> y/o <i>Rickettsia sp.</i>
I-32	Indiana-Loreto	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Perro	<i>Rickettsia felis</i>
V-88	Viñani-Tacna	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i> Garrapata <i>Rhipicephalus sanguinus</i>	Perro	<i>Rickettsia felis</i>
M-21	Mazan-Loreto	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	<i>Rickettsia endosimbionte</i> y/o <i>Rickettsia sp</i>
CN-89	Ciudad Nueva-Tacna	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	<i>Rickettsia felis</i>
S-13	Samaria-Loreto	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	<i>Rickettsia endosimbionte</i> y/o <i>Rickettsia sp.</i>
M-3	Mazan-Loreto	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Perro	<i>Rickettsia endosimbionte</i> y/o <i>Rickettsia sp.</i>
M-68	Mazan-Loreto	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Gato	<i>Rickettsia endosimbionte</i> y/o <i>Rickettsia sp</i>
CN-77	Ciudad Nueva-Tacna	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i>	Perro	<i>Rickettsia felis</i>
MZ-522	Tacna	Pulga <i>Ctenocephalides felis</i> Garrapata <i>Rhipicephalus sanguinus</i>	Perro	<i>Rickettsia felis</i>

Cuadro 10: Resultados del secuenciamiento de los vectores

7- DISCUSION

En general, el grupo poblacional de localidades fronterizas de los 4 Departamentos estudiados exhibió una distribución similar en género, edad y condiciones previas (viajes previos, entre otros). Sin embargo, fueron observadas algunas diferencias en condiciones de vivienda y saneamiento, que en algunos casos se acentúan; así, las “buenas condiciones” disminuyen ostensiblemente para el caso de la Región Loreto, que conglobera sus porcentajes en la condición “regular “ y “deficiente”, encontrándose similar situación para Tumbes y Tacna, lo cual refuerza el hecho de estar trabajando con poblaciones de nivel socioeconómico bajo a muy bajo. En cuanto a la presencia de vectores peri domiciliarios, si bien en la población total se encuentra una proporción significativa de contacto previo y mayor presencia (81.35 %), en el grupo de casos positivos, no fue posible detectar un incremento importante (7/31, 22.58 %), lo cual probablemente se deba más a una desinformación por parte de los encuestados, ya que en publicaciones anteriores (51, 52, 53, 54) para nuestro país, los autores hacen mención a la relación persistente de las rickettsiosis con la presencia de vectores como *Ct.felis*, principalmente y diversas especies de garrapatas como *Amblyomma maculatum*, *Anocentor nitens* e *Ixodes boliviensis* (78); haciéndose hincapié en la importancia de establecer las características clínicas y epidemiológicas y determinar que especies de rickettsias estarían circulando (53).

La alta prevalencia de pacientes asintomáticos o con síntomas inespecíficos que dificultan la caracterización de la enfermedad es probablemente debido a la endemicidad de ésta en las zonas estudiadas (54), que ha llevado a la atenuación de los síntomas debido a la reducción de los genomas en las especies de rickettsias circulantes, perdiendo en muchos casos su expresión de patogenicidad (4, 72). No obstante, esta situación amerita un monitoreo epidemiológico o vigilancia continua para estar preparados en el tiempo ante el surgimiento de enfermedades emergentes y re-emergentes de este tipo.

Los criterios de inclusión/exclusión para la obtención de las muestras no discriminaron entre sintomáticos y asintomáticos, lo cual ha producido un sesgo en la captación de positivos para aislamiento, disminuyendo ostensiblemente la oportunidad de recuperación de una carga microbiana óptima, más aun cuando los tiempos para colecta de muestras fueron aleatorios y sujetos al momento de la entrevista y rara vez coincidió con una etapa febril para infección

activa. Además hay que tomar en cuenta que los síntomas y signos de las rickettsiosis corresponden a cuadros inespecíficos lo cual ameritaría descartar otras etiologías concomitantes e incluso habría que evaluar el impacto en la evolución de tales cuadros.

Los cultivos de *Rickettsia* para su aislamiento siempre han sido descritos como fastidiosos de ser mantenidos y propagados (15, 81, 82), especialmente cuando provienen de muestras clínicas como sangre total de humanos, en los que la carga bacteriana es muy baja debido a que se captan los casos generalmente en fases avanzadas de la infección, cuando el periodo febril ya ha sido superado, en ocasiones provenientes de individuos con tratamiento antibiótico establecido. Muchas veces proceden de regiones endémicas y asimismo pueden manifestarse durante coinfecciones con otros agentes o estados inmunitarios comprometidos (12, 21). En el caso de nuestra muestra poblacional no se delimitó bien este aspecto porque era búsqueda en poblaciones no necesariamente con características clínicas establecidas.

Las dificultades encontradas para la propagación de los aislamientos, a fin de elevar la carga microbiana, provienen del hecho de no haberse tenido las condiciones óptimas para que los productos se mantengan a través de sucesivos pasajes tal como se recomienda, uno de los factores que no se pudo manejar fue el haberse empleado un medio de suspensión para mantenimiento, con sucrosa y glutamato (SPG), lo cual si bien es mejor que usar buffer fosfato salina, no resulta del todo recomendable dado que la utilización de oxígeno por rickettsias, siendo más baja que la de otros microorganismos, disminuye en un 20% en presencia de SPG, reduciéndose su infectividad en los cultivos probablemente por inactivación metabólica y también cambios en la permeabilidad de la membrana rickettsial. No obstante, este efecto adverso producido puede ser fácilmente revertido añadiendo pequeñas proporciones de caldo triptosa fosfato ó caldo infusión cerebro corazón a los cultivos, el cual le suministra un factor nutritivo extra que restaura la capacidad de la bacteria para ingresar a las células o multiplicarse en ellas cuando ya ingresaron, aun cuando esta posibilidad ha sido cuestionada por desconocerse el mecanismo exacto involucrado (83). Una función del caldo triptosa fosfato para cultivos de Rickettsias en células de mamífero como la línea celular Vero, puede estar relacionada a la cadena de transporte de electrones del ciclo de Krebs, pues los componentes activos del caldo triptosa fosfato son de origen pirimidínico y están implicados en la vía de biosíntesis de la pirimidina, la cual está conectada a la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La disminución en la producción de ATP mitocondrial parece verse compensada

por un incremento en la actividad de la piruvato quinasa y de la lactato dehidrogenasa, por lo cual es muy importante el suplemento de piruvato de sodio en el medio de cultivo, ya que el EMEM no lo contiene (84).

En suma, la calidad y naturaleza de nutrientes para la propagación, según composición del medio de cultivo y suplementos adicionados, es tan crucial como la temperatura a la cual son sometidos los cultivos. La mayor parte de los medios usualmente empleados para cultivo celular, carece de algunos factores necesarios para la actividad biológica normal de las rickettsias, obteniéndose por ello súbitas disminuciones en infectividad al ser suspendidas o mantenidas en medios no favorables.

Otro punto crítico es el suministro de anhídrido carbónico (CO₂) al 5% en el ambiente de la incubación, aun cuando se emplee sistemas de cultivo cerrado como los Shell viales con tapones de silicona, ya que sabemos que son microorganismos microaerófilicos y por tanto acidifican o alcalinizan muy rápido, impactando sensiblemente en el desarrollo. Asimismo, en algunos estudios (85) se recomienda el cambio de medio de cultivo, por uno fresco, cada semana de incubación a fin de evitar el estancamiento de la multiplicación celular; lo cual hemos establecido como una práctica cotidiana recientemente. En nuestra experiencia, es decepcionante obtener un resultado IFI y/o PCR negativo cuando ya era evidente un avance en la evidencia de efecto citopático. A parte de lo mencionado, no se logró identificar más condiciones particulares que pudiesen haber influenciado en la recuperación de los aislamientos primarios durante los sub cultivos y las corridas PCR.

El presente estudio emplea, por primera vez en Perú, aislamientos de origen humano procedente de estudio previo (75), los que han sido caracterizados molecularmente, como previamente se hizo solo en vectores (86), a fin de conocer las especies circulantes en zonas de frontera de nuestro territorio en un periodo de tiempo y compararlos con la información disponible de lo que ocurre en países vecinos como Brasil, Colombia, Chile, entre otros.

En el año 2013, en la localidad de General Lavalle-Provincia de Buenos Aires, Argentina, se encontró a la garrapata dura *Amblyomma triste* infectada con la especie *Rickettsia parkeri*; y se sabe que en esta región han sido reportados casos de enfermedad humana atribuida a este microorganismo. En el estudio argentino, la detección molecular de *R.parkeri* fue hecha en base a la amplificación por PCR del fragmento de 400-pb del espaciador intergénico 23S-5S y un fragmento de 500-pb del gen codificante de la proteína de 190-kDa de la membrana externa.

El 6.97% de las 43 garrapatas *A. triste* resultaron ser positivas a *R. parkeri*. A partir de estos resultados se evidenció que *A. triste* es el vector de *R. parkeri* en el área de estudio. Los hallazgos de este trabajo tienen relevancia epidemiológica debido a que frecuentemente ha sido reportado el parasitismo humano por garrapatas *A. triste* en algunas áreas ribereñas de Argentina y Uruguay y pueden surgir nuevos casos de rickettsiosis por *R. parkeri* en localidades sudamericanas en donde los humanos son expuestos a picaduras por estas especies de garrapatas (24).

Para el Perú se reconocen antecedentes de estudios moleculares en el trabajo de Blair y col. en 2004 (78) habiéndose hallado evidencia de la presencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en pulgas y garrapatas colectadas en tres localidades de la región noroeste del territorio peruano en el contexto del foco de un brote de enfermedad febril en humanos atribuida en parte a infección rickettsial por fiebre manchada. La identificación molecular de los agentes etiológicos a partir de dichas muestras fue determinada después de secuenciamiento parcial del gen del antígeno común de 17-kDa (*htrA*) así como la comparación en homología de la secuencia nucleotídica con uno o más de los siguientes genes: *gltA*, *ompA*, and *ompB*. La amplificación y secuenciamiento de porciones de los genes *htrA* y *ompA* en muestras obtenidas a partir de pulgas identificó el patógeno *Rickettsia felis*. Cuatro muestras de garrapatas dieron evidencia molecular de la presencia de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas. Si bien los agentes identificados en las muestras de pulgas y garrapatas no han sido relacionados a casos humanos en el área, los resultados demuestran por vez primera que al menos dos agentes rickettsiales del grupo SFG estaban circulando en el norte del Perú al momento del brote.

Análisis moleculares adicionales de secuencias derivadas de las dos especies separadas de las garrapatas duras identificó un miembro posiblemente nuevo de rickettsia SFG.

Al año siguiente (2005) fue aclarada esta incógnita con el trabajo de Jiang y col, (79) quien caracterizó la nueva especie identificada mediante análisis filogenéticos de 5 genes rickettsiales (17-kDa *gltA*, *ompB*, *ompA*, y *sca4*) a partir de dos aislamientos moleculares de *Candidatus Rickettsia andeanae* procedentes de dos especies de garrapatas (*Amblyomma maculatum* e *Ixodes boliviensis*) colectadas a partir de caballos domésticos procedentes de dos localidades separadas, en el norte del Perú.

En el presente estudio también fuimos capaces de identificar *R. felis* en 5 muestras de vectores (pulgas y garrapatas) obtenidas a partir de perros y gatos de localidades fronterizas de la región Loreto (1) y de Tacna (4). La presencia de *R. felis* en territorio peruano ya había sido previamente identificada (78, 79). Además se evidencia por primera vez en el Perú la presencia de *R. endosimbionte* en muestras de vectores de 3 de las regiones (Madre de Dios, Loreto y Tacna), siendo para todos los casos, el vector infectado la pulga *Ctenocephalides felis*, obtenida tanto de perros como de gatos. La identificación de estas especies circulantes indica la importancia de la profundización del estudio molecular para el mejor conocimiento del perfil de circulación y la epidemiología de las bacterias del género *Rickettsia* en el territorio peruano.

8. CONCLUSIONES

- El grupo poblacional de localidades fronterizas de los 4 Departamentos estudiados no exhibió diferencias significativas en resultados relacionados a distribución de género, edad, viajes previos, entre otros. Con relación a condiciones de vivienda y saneamiento hubo una mayor proporcionalidad para condiciones regulares en las cuatro regiones estudiadas, y una distribución en general baja para buenas condiciones.
- En cuanto a la presencia de vectores peri domiciliarios, tanto el grupo poblacional total con 81.35 %, como el grupo de positivos verificados con el 80.64 % de afirmación, evidenciaron una proporción significativa para la participación de éste factor.
- La alta prevalencia de pacientes asintomáticos o con síntomas inespecíficos que dificultan la caracterización de la enfermedad es probablemente debido a la endemidad de ésta en las zonas estudiadas , que ha llevado a la atenuación de los síntomas debido a la reducción de los genomas en las especies de rickettsias circulantes, perdiendo en muchos casos su expresión de patogenicidad .
- Los criterios de inclusión/exclusión para la obtención de las muestras en el estudio previo no discriminaron entre sintomáticos y asintomáticos, lo cual ha producido un sesgo en la captación de positivos para aislamiento, disminuyendo ostensiblemente la oportunidad de recuperación de una carga microbiana óptima, más aun cuando los tiempos para colecta de muestras fueron aleatorios y sujetos al momento de la entrevista y rara vez coincidió con una etapa febril para infección activa.
- Hubo inconvenientes para realizar el secuenciamiento de los aislamientos de humanos procedentes de cultivo celular de mamífero debido a los retrasos en obtención de suficiente masa bacteriana y las dificultades para la purificación del genoma bacteriano del celular, no permitieron que todos los genes propuestos fueran analizados. Apenas fueron verificados el htrA de 17kDa y el gltA.

- La utilización de vectores (pulgas y garrapatas) epidemiológicamente relacionados a los aislamientos humanos, para el secuenciamiento molecular de las bacterias intracelulares permitió la identificación de las especies *Rickettsia felis* y *Rickettsia sp*, reportadas previamente en el país y *Rickettsia endosimbionte* , aún no reportadas en territorio peruano.

9. CONSIDERACIONES FINALES

El presente trabajo incursiona por primera vez en intentos de caracterización de especies circulantes de rickettsias a partir de muestras humanas procedentes de cuatro zonas de la frontera peruana, colectadas con motivo de un estudio poblacional para detectar prevalencia, siendo en su mayoría asintomáticas, no resultando propicio para los objetivos trazados por constituir una pobre carga microbiana, muy probablemente proveniente de portadores endémicos, evidenciándose en bandas tenues en PCR para genes *htrA* y *gltA*, requiriéndose múltiples pasajes de propagación para levantar la carga microbiana. Habiéndose efectuado el secuenciamiento de todos modos, no se obtuvo lecturas válidas a partir de las muestras humanas, pero si para muestras de vectores obtenidos en el periodo de estudio durante el estudio previo realizado, hallándose homología para las especies *Rickettsia felis* y *Rickettsia sp* en concordancia con estudios previos realizados, y también para *R. endosimbionte*, especie aún no reportada para nuestro país.

La estandarización, implementación, desarrollo y aplicación de técnicas biológicas y moleculares especializadas, con motivo de éste estudio fortalece la capacidad institucional y nacional para lograr un sistema de vigilancia eficaz de las rickettsiosis en territorio peruano.

Constituye objetivo primordial para el Área de Rickettsiosis del Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del Centro Nacional de Salud Pública del INS, continuar con los estudios iniciados a través del presente trabajo, ya que como Centro de Referencia Nacional nos corresponde señalar el camino para sentar las bases del conocimiento en este grupo de enfermedades emergentes y re emergentes, desarrollando no solo la vigilancia sino también la investigación clínica y científica basada en procedimientos de laboratorio altamente eficaces, sensibles, específicos y de amplia accesibilidad, lo cual no sería posible si no se cuenta con la información necesaria acerca de las características biológicas, moleculares y epidemiológicas del agente infeccioso involucrado.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Oberoi A & Singh N. Rickettsiae Infections-Classification. *Journal of Medical Education & Research* 2010; 12(2): 57-59.
2. Díaz JS, Cataño JC. Fiebre manchada de las montañas rocosas: ni tan manchada ni tan montañosa como pensábamos. *Infectio* 2010; 14(4): 264-276.
3. Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol* 2009; 7:6.
4. Merhej, V & Raoult, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biological Reviews* 2011; 86(2): 379-405.
5. Reisen WK. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annual review of entomology* 2010; 55: 461-483.
6. Portillo A, Oteo JA. Rickettsiosis as Threat for the Traveller. *Current Topics in Tropical Medicine*. 2012; 978-953.
7. Gómez RN, Álvarez HG, García ZMG, Fonseca CI, Cano RMA, Villalobos GL et al. Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en niños. Informe de 18 casos. *Rev Mex Pediatr* 2009; 76(6): 245-250.
8. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases* 2010; 14(8): 667-676.
9. Brouqui, P. Arthropod-borne diseases associated with political and social disorder. *Annual review of entomology* 2011; 56: 357-374.
10. González TM, Mattar VS. Ratas, ácaros, guerras, pobreza, negligencia y rickettsiosis. *Revista MVZ Córdoba* 2011; 16: 2433-2434.
11. Randolph SE. Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology* 2009; 136(12): 1403-1413.
12. Galvão MAM, Freitas A. Conferencias magistrales- Enfermedades rickettsiales: ¿Un problema de salud pública en América Latina? *Acta Méd Costarricense* 2013; 55 (3):7-10.
13. Valbuena G. Conferencias Magistrales: Rickettsiosis: pathogenesis, inmunidad y desarrollo de vacunas. *Acta Médica Costarricense* 2013; 55 (3):48-59.
14. Cutler SJ, Fooks AR, Van Der Poel WH. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging infectious diseases* 2010;16(1): 1.
15. Richards AL. Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2012; 64(1): 107-110.
16. Eremeeva ME. Molecular epidemiology of rickettsial diseases in North America. *Ticks and tick-borne disease* 2012; 3: 331-336.
17. Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N & Hofmann-Lehmann R.. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and Ixodes ticks. *Applied and environmental microbiology* 2009; 75(10): 3230-3237.
18. Bermúdez CSE, Zaldívar AY, Spolidorio MG, Moraes-Filho J, Miranda RJ, Caballero CM et al. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Veterinary parasitology* 2011; 177(1): 134-138.
19. Sentausa E. et al. Genome Sequence of “*Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae*”. *J Bacteriol* 2012; 194 (9): 2389–90.

20. Eremeeva ME, Berganza E, Suarez G, Gobern L, Dueger E, Castillo L et al. Investigation of an outbreak of rickettsial febrile illness in Guatemala, 2007. *International Journal of Infectious Diseases* 2013; 17: 304–311.
21. Buitrago DA, Pachón HE. Epidemiología de las Rickettsiosis. Una Revisión Narrativa. Aportes para la Vigilancia Epidemiológica. Medidas de presentación y factores asociados. (Trabajo de grado para optar al título de Especialistas en Epidemiología). Universidad de Antioquia, Facultad Nacional de Salud Pública Héctor Abad Gómez, Sede Bogotá, 2008.
22. Ribeiro MD, Furtado MA., Ferraudo AS, Cesario M, Morraye MDA. Fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da febre maculosa no estado de São Paulo. *Hygeia* 2013; 9(16): 103-114.
23. Romer Y, Seijo AC, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Lash RR et al. Rickettsia parkeri rickettsiosis, Argentina. *Emerg infect dis* 2011; 17(7): 1169-1173.
24. Venzal JM. *Rickettsia parkeri*: A Rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for Spotted Fever Rickettsiosis in southern Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(3):131-4,
25. Venzal JM & Nava S. El género Rickettsia como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. *Rev Med Urug* 2011; 27: 98-106
26. Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1166:156-166.
27. Santibáñez S, Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, & Oteo JA. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2013; 31(5): 283-288.
28. Troyo A et al. Short Report: Rickettsia felis in Ctenocephalides felis from Guatemala and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2012; 86(6): 1054–6.
29. Zavala-Castro. Rickettsia felis: un patógeno emergente en Latinoamérica. *Acta Médica Costarricense* 2013; 55 (1): 11-12.
30. Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Guglielmone AA. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus “Rickettsia amblyommii”* in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microbial Ecology* 2009; 54:126-133.
31. Forshey BM, Stewart A, Morrison AC, Gálvez H, Rocha C, Astete H et al. Epidemiology of spotted fever group and typhus group rickettsial infection in the Amazon basin of Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2010; 82(4): 683-690.
32. Fonseca L, Marcello G, Martins AV. Febre Maculosa: Revisão de literatura–artigo de revisão. *Saúde & Ambiente em Revista* 2009; 2(1): 1-20.
33. Hidalgo M, Faccini AA, Valbuena G. Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. *Biomédica* 2013; 33(1): 1-54.
34. Uchiyama T. Tropism and pathogenicity of rickettsiae. *Front Microbiol.* 2012; 3 (230): 1-11
35. Paddock CD, Fournier PE, Sumner JW, Goddard J, Elshenawy Y, Metcalfe MG et al. Isolation of Rickettsia parkeri and identification of a novel spotted fever group Rickettsia sp. from Gulf Coast ticks (Amblyomma maculatum) in the United States. *Applied and environmental microbiology* 2010; 76(9): 2689-2696.

36. Ereemeeva ME, Karpathy SE, Krueger L, Hayes EK, Williams AM, Zaldivar Y. Detection and identification of flea-borne Rickettsiae in areas endemic for murine typhus in California. *Journal of Medical Entomology* (2012) 49, 1485-1494.
37. Álvarez HG, & Contreras Soto JJ. Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de Sonora, 2004-2012. *Salud Pública de México* 2013; 55(2): 151-152.
38. Hun L, Troyo A, Taylor L, Barbieri AM, Labruna MB. First Report of the Isolation and Molecular Characterization of *Rickettsia amblyommii* and *Rickettsia felis* in Central America. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(10): 1395-1397.
39. Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol*; 2013; 3 (27): 1-9.
40. Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:521-523.
41. Silva N, Ereemeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EAG, ET al. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg infec dis* 2011, 17(2): 275.
42. Quintero Vélez JC, Hidalgo M, Rodas JD. Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 2012, 17 (1): 82-99.
43. Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, et al.. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(4): 687-692.
44. Labruna MB et al. Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Rev.MVZ Córdoba* 2011, 16(2):2435-2457.
45. Nicholson WL, Allen KE, McQuiston JH, Breitschwerdt EB, Little SE. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in parasitology* 2010; 26(4): 205-212.
46. Gehrke FS, Angeram RN, Marrelli MT, de Souza ER, do Nascimento EM, Colombo S & Schumaker TT. Molecular Characterization of Mediterranean Spotted Fever Rickettsia Isolated From a European Traveler in the State of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Travel Medicine* 2013, 20(1): 54.
47. Camacho JR et al. Typhus fever occurrences in two rural communities in Urcos-Cusco- Diagnóstico 1985, 15: 17-21.
48. Raoult D, Woodward T, Dumler S. The history of epidemic typhus. *Infect Dis Clin North Am* 2004; 18: 127-140.
49. Olano JP et al . Epidemic typhus outbreaks in Cuzco, Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1997; (Suppl.) 60: 282.
50. Pachas PE et al. Brote de tifus murino en la provincia de Huari. Libro de resúmenes VI Congreso de Enfermedades Infecciosas y Tropicales 1999- Lima, Perú.
51. Pachas PE, Morón C, Hoyos A, et al. *Rickettsia felis* identified in *Ctenocephalides canis* fleas from Peruvian Andes. Presented at the ASR/Bartonella Joint Conference. Big Sky, Montana, USA, 2001.
52. Sihuíncha M, Anaya E, Carranza V, Durand S. Evidencia serológica de la presencia de Rickettsias del grupo de la fiebre manchada en la Amazonía del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2006; 23(4): 284-7.

53. Ramal C, Díaz E, López J. Rickettsiosis, enfermedad emergente en Loreto. Evidencia serológica de 20 casos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2007; 24(1): 99-100.
54. Mostorino R, Anaya E, Mendoza, L. Identificación de una nueva área de infección por rickettsias del grupo typhi: estudio de un brote de tifus en Huánuco. *Rev peru med exp salud pública* 2003; 20(1): 15-21.
55. Bowman DD. Introduction to the Alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia and Anaplasma. *Topics in Companion Animal Medicine* 2011, 26(4), 173-177.
56. Fields KA, Heinzen RA, & Carabeo R. The obligate intracellular lifestyle. *Front microbiol*, 2011; 2: 99.
57. Walker, DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clinical infectious diseases* 2007, 45(Supplement 1):39-44.
58. Gueguen G, Rolain JM, Zchori-Fein E, Vavre, F, Fleury F, & Raoult D. Molecular detection and identification of Rickettsia endosymbiont in different biotypes of Bemisia tabaci. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15(s2): 271-272.
59. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in Parasitology* 2012; 28 (10): 437-446.
60. Merhej V, El Karkouri K, Raoult D. Whole genome-based phylogenetic analysis of Rickettsiae. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15 (s2): 336-337.
61. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Sulú Uicab JE. Murine typhus in child, Yucatan, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:972-4.
62. Hirunkanokpun S, Thepparit C, Foil LD, Macaluso KR . Horizontal transmission of Rickettsia felis between cat fleas, Ctenocephalides felis. *Mol Ecol*. 2011 Nov; 20(21):4577-86.
63. Abramowicz KF, Wekesa JW, Nwadike CN, Zambrano ML, Karpathy SE, Cecil D, Burns J, Hu R, Eremeeva ME. Rickettsia felis in cat fleas, Ctenocephalides felis parasitizing opossums, San Bernardino County, California. *Med Vet Entomol*. 2012 Dec; 26(4):458-62.
64. Raoult D. Emerging rickettsioses reach the United States. *Clin Infec dis* 2010; 51(1):121-2.
65. Prakash, J. A. J., Sohan Lal, T., Rosemol, V., Verghese, V. P., Pulimood, S. A., Reller, M., & Dumler, J. S. (2012). Molecular detection and analysis of spotted fever group Rickettsia in patients with fever and rash at a tertiary care centre in Tamil Nadu, India. *Pathogens and Global Health*, 106(1), 40-45.
66. Gillespie JJ, Ammerman NC, Beier-Sexton M, Sobral BS, Azad AF. Louse- and flea-borne rickettsioses: biological and genomic analyses. *Vet Res* 2009; 40(2): 12.
67. Zavala C, Jorge, Ruiz S, Alfredo, & Zavala V, Jorge. Las Rickettsias del grupo de las fiebres manchadas: Respuesta inmune y sus proteínas inmunodominantes. *Revista médica de Chile* 2004, 132(3), 381-387.
68. Pallen MJ y Wren BW. The HtrA family of serine proteases. *Molecular Microbiology* 1997, 26(2): 209-221
69. Jong-Hyun Kim, y Myong-Joon Hahn. Cloning and Sequencing of the Gene Encoding the Candidate HtrA of Rickettsia typhi. *Microbiol. Immunol*. 2000, 44(4): 275-278.

70. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Apr;47(2):252-61.
71. Clarridge III, JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, Vol. 17, No. 4, p. 840–862.
72. Stothard DR, Clark JB y Fuerst P A. Ancestral Divergence of *Rickettsia bellii* from the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* and Antiquity of the Genus *Rickettsia*. *International Journal of systematic Bacteriology* 1994, Vol. 44, No. 4, p. 798-804
73. Ministerio de Salud Perú – Home Portal Instituto Nacional de Salud- Sistema de Información de resultados por Internet NET LAB.
74. Estrada-Peña A, Ayllón N, De La Fuente J. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in physiology* 2012; 3 (64): 1-12.
75. Anaya et al. Infecciones rickettsiales transmitidas por pulgas y garrapatas en cuatro poblaciones fronterizas del Perú: Tumbes, Tacna, Loreto y Madre de Dios, 2010-2012. Poster VI Congreso Científico del Instituto Nacional de Salud, 30-Noviembre-2012.
76. UTMB. IFA procedure for detection of antibodies to *Rickettsia rickettsii*. *Infectious Diseases Reference Laboratory, Department of Pathology. Galveston, Texas, 2003, 1-6.*
77. Anderson BE, Tzianabos T. Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. *J.Bacteriology* 1989, 171: 5199-5201.
78. Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Morón C, Anaya E, Céspedes M et al. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *Journal of clinical microbiology* 2004; 42(11): 4961-4967.
79. Jiang J et al. Phylogenetic Analysis of a Novel Molecular Isolate of Spotted Fever Group Rickettsiae from Northern Peru *Candidatus Rickettsia andeanae*. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2005; 1063: 337–342.
80. Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S y Polz MF. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72(3): 2221-2225.
81. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses:current approaches to diagnosis for old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2715-27.
82. Blanco JR, Jado I, Marín M, Sanfeliu I, Portillo A, Anda P. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2008; 26(9):573-80.
83. Wike DA, Ormsbee RA, Tallent G y Peacock MA. Effects of Various Suspending Media on Plaque Formation by *Rickettsiae* in Tissue Culture. *Infection and immunity*, 1972, Vol. 6, No. 4, p. 550-556.
84. Saisongkorh W, El Karkouri K, Patrice JY, Bernard A, Rolain JM y Raoult D. Short Communication. Tryptose phosphate broth improves *Rickettsia felis* replication in mammalian cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, N° 64 111–114.
85. Paddock CD. Perspectivas sobre el diagnóstico de laboratorio de enfermedades rickettsiales en el siglo 21. *Acta Méd Costarricense* 2013; 55 (3): 13-24.

86. Cicuttin G & Nava S. Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2013; 108(1): 123-125.

ANEXO 2

EXTRACCION DE MATERIAL GENOMICO A PARTIR DE AISLAMIENTOS

(Kit de Invitrogen PureLink)

Lisis celular

1. Se descongelaron los aislamientos y se homogenizaron en vórtex manteniéndolos a 4°C.
2. Se colocaron 200 µL en tubos eppendorff con 200 µL de buffer de lisis, 20 µL de Proteinasa K y 20 µL RNasa A del Kit, homogenizando suavemente con micropipeta.
3. Se incubó por 2 minutos.
4. Se llevó a baño maría de 55°C por 30 minutos..
5. Se agregó 200 µL de etanol frío al 100%, homogenizando por inversión durante 5 segundos.

Anclaje del DNA

1. Se colocó la mezcla anterior hacia una columna spin PureLink depositada en un tubo colector.
2. Se centrifugó a 12 000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Se descartó el tubo colector y se depositó la columna en un nuevo tubo colector

Lavado del DNA

1. Se agregó 500 µL del buffer de lavado 1 PureLink.
2. Se centrifugó a 12 000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Se descartó el tubo colector y se depositó la columna en un nuevo tubo colector.
4. Se agregó 500 µL del buffer de lavado 2 PureLink.
5. Se centrifugó a 14 000 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente.

Elución del DNA

1. Se depositó la columna en un nuevo tubo colector y se agregó 30 µL de buffer de elusión PureLink.
2. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Se centrifugó a 14 000 RPM por 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Se agregó 30 µL de buffer de elusión PureLink.
5. Se centrifugó a 14 000 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente.
6. Se traspasó todo lo recuperado hacia un tubo eppendorff nuevo de 1.5 mL.
7. Se almacenó a 4°C hasta por 12 horas para luego almacenar a -20°C.

ANEXO 3

EXTRACCION DE MATERIAL GENOMICO A PARTIR DE VECTORES

1. Se trituró y homogenizó un pool de vectores por cada una de las muestras en 250 ul de buffer de lisis 1X y 20 ul de proteinasa K (10mg/ml).
2. Se agregó 200 ul de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (20:20:1), homogenizando por inversión.
3. Se centrifugó a 13 000 rpm por 2 min.
4. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se repitió los dos pasos anteriores hasta que el sobrenadante quedará translúcido.
5. Se agregó 200 ul de alcohol absoluto, colocando a -20° por 10 min, para luego centrifugar a 13,000 rpm por 3 min.
6. Se descartó el sobrenadante y se agregó 200 ul de alcohol de 70° para luego centrifugar a 13,000 rpm por 3 min.
7. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el tubo y se agregó 70 ul de buffer TE.
8. Se dejó a 4°C por un máximo de 12 horas, almacenando luego a -20°C.

ANEXO 4

Protocolo de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del gen 17KDa

Etapa	Temperatura	Ciclos	Tiempo
Denaturación inicial	94°C	1	3 min
Denaturación	94°C	40	30 seg
Hibridación	48°C		30 seg
Extensión	72°C		30 seg
Extensión final	72°C	1	5 min

ANEXO 5

Protocolo de reacción para secuenciamiento de amplificados

Etapa	Temperatura	Ciclos	Tiempo
Denaturación inicial	96°C	1	1 min
Denaturación	96°C	35	10 seg
Hibridación	48°C		45 seg
Extensión	60°C		1 min
	4°C	1	∞

.....