

## Protocolo para Proyecto de Investigación 2013

### Título del proyecto

La Fiebre Manchada en la Comarca Lagunera: Detección molecular de *Rickettsia rickettsii* (Wolbach) Brumpt en *Rhipicephalus sanguineus* Latreille.

### Introducción

Las garrapatas son el segundo grupo más importante de artrópodos vectores de enfermedades a los animales y al hombre. Son parásitos obligados que al alimentarse de sus hospedantes transmiten diversos patógenos tales como bacterias, espiroquetas, rickettsias, protozoarios, virus, nematodos; pudiendo además transmitir toxinas (Márquez, 2005). Estas pueden ser un riesgo zoonótico al encontrarse dentro de los hogares, entrar en contacto con el hombre y buscar condiciones ambientales favorables para subsistir (Quintero *et al.*, 2004).

Entre las enfermedades en donde se involucran a las garrapatas se encuentra la Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas (Spach *et al.*, 1993); ésta es una enfermedad infecciosa y potencialmente mortal, transmitida por *Rickettsia rickettsii* (Feigin *et al.*, 1992). La rickettsia fue descrita en 1909 por Howard Taylor Ricketts como agente causal de la enfermedad. Inicialmente se manifestó en el Valle de Idaho en 1896 y la llamaron sarampión negro, en 1900 ya se tenía referencia de ella en Washington y Montana, California, Arizona y Nuevo México (De Lara y Cárdenas, 2008).

En 1925 Hofman realizó la primera monografía sobre la Fiebre Manchada en Sinaloa, México. En 1939 se reportaron tres muertes en Gómez Palacio, Durango y en 1943 se aisló por primera vez en sangre humana el germen causante de la enfermedad en El Fuerte, Sinaloa. En 1945 Bustamante y colaboradores identificaron como vector de *R. rickettsii* a la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* en Sinaloa. En 1945 el Dr. Elizondo y sus colaboradores describieron la enfermedad atribuida a una garrapata en la Comarca Lagunera con alta letalidad. En un periodo de 32 años (1975-2007) se han documentado 115 casos y 54 muertes en Torreón, Coahuila. Los pacientes presentaron fiebre, exantema, cefalea, mialgias, somnolencia, convulsiones, edemas, dolor abdominal, sangrado, hepatomegalea y esplenomegalea (De Lara y Cárdenas, 2008).

De la información analizada se desprende que:

- Las garrapatas son vectores de enfermedades zoonóticas poco estudiadas en México.
- No se tiene certeza sobre la distribución territorial específica del vector *R. sanguineus*.

Al adquirir la enfermedad de la fiebre manchada es confundida con dengue debido al cuadro clínico que ocasiona, propiciando un diagnóstico erróneo del agente causal.

### Objetivos

#### GENERAL:

- Determinar si el ADN de *R. rickettsii* está presente en *R. sanguineus* con el método de PCR.

#### ESPECIFICO:

- Identificar si *R. sanguineus* es vector de *R. rickettsii*.
- Establecer las regiones urbanas zoonóticas de la Comarca Lagunera donde se encuentre al vector de la Fiebre Manchada.
- Determinar la distribución espacial del vector positivo a *R. rickettsii* en zonas de emergencia de la Comarca Lagunera.

### Hipótesis

El ADN de *R. rickettsii* está presente en *R. sanguineus* en zonas con alta incidencia de la enfermedad.

### Revisión de Literatura

La mayoría de los vertebrados terrestres están sujetos al ataque de las garrapatas, pero los mamíferos son los más vulnerables porque el olor y calor corporal que desprenden es muy atractivo para ellos. La sangre, los desechos celulares y otros líquidos tisulares son el alimento de las garrapatas adultas y todos los estadios inmaduros activos (

Harwood & James, 1993).

Las garrapatas conforman alrededor de 821 especies divididas en tres familias: Argasidae (garrapatas duras), Ixodidae (garrapatas blandas) y Nuttalliellidae (Klompen *et al.*, 2000). La familia Ixodidae alberga a cuatro subfamilias, 13 generos y 650 especies; Argasidae tiene cinco géneros y 170 especies y la familia Nuttalliellidae se encuentra en África y tiene una sola especie *Nuttalliella namaqua* (Bedford) (Hoogstraal, 1978).

Las garrapatas macho y hembra se alimentan de sangre. En el género *ixódide* solo la hembra aumenta de tamaño y en Argáside los dos (macho y hembra) se ensanchan en igual proporción. Los ixódidos son garrapatas de tres huéspedes, las hembras dejan al tercer huésped después de alimentarse, ovipositan y finalmente mueren (Harwood & James, 1993). Cuando no encuentran hospedantes específicos, atacan a otras especies diferentes de las que se alimentan (Friedhoff, 1990); las especies del género *Amblyomma* se fijan en bovinos, perros, venados, pájaros y humanos (Lavender *et al.*, 1996); el género *Boophilus* solo ataca ganado vacuno y venados. Las del género *Dermacentor* atacan a vacas, venados, ratones, humanos, gatos, perros, caballos y otras especies (Pereira *et al.*, 2000). Las garrapatas del género *Haemaphysalis* prefieren conejos y aves. El género *Ixodes* ataca perros, venados, caballos, humanos, ratones, aves y otros mamíferos pequeños (Jittapalapong *et al.*, 2000); y las del género *Rhipicephalus* atacan perros y raramente al ganado vacuno y al hombre (Hoskins, 1991). Los roedores son hospedantes de garrapatas inmaduras, éstos permiten la presencia y diseminación de la enfermedad llamada fiebre de las montañas (Kollars, 1996).

Las secreciones de las glándulas salivales de las garrapatas son importantes en la transmisión de patógenos (Manjula y Rao, 1996), es en la saliva donde se encuentra el agente infeccioso y se inyecta al hospedante después de fijarse en la piel (McKenzie, 1998). Las secreciones ingresan al torrente sanguíneo pasando a los tejidos en donde se fija, provocando la pérdida de agua y electrolitos (Ribeiro, 1987).

Las garrapatas (Acari: Ixodidae) son vectores de muchos microorganismos como: *Babesia* sp., *Borrelia* sp., *Rickettsia* sp., y *Ehrlichia* sp. Están implicadas en la transmisión de numerosas enfermedades zoonóticas, ya que pueden alimentarse de diferentes tipos de hospederos durante su ciclo de vida (Márquez, 2005). Una de las enfermedades que transmiten es la Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas (Spach *et al.*, 1993). Son un riesgo zoonótico cuando entran a las casas en contacto con los humanos. Algunas especies de garrapatas son vectores de *Rickettsia rickettsii*, que es la responsable de causar la Fiebre Manchada (Quintero *et al.*, 2004).

Clasificación taxonómica de *Rickettsia rickettsii* según Stackebrandt *et al.*, 1986.

#### Nivel / Ubicación

Dominio: Bacteria

Reino: Procarionte

Filum: Proteobacteria

Clase: Proteobacteria alfa

Orden: Rickettsiales

Familia: Rickettsiaceae

Género: *Rickettsia*

Especie: *R. rickettsia* (Wolbach) Brumpt

*R. rickettsii* es una bacteria intracelular gram-negativa del grupo de las Fiebres Manchadas, del orden Rickettsiales y del género *Rickettsia*. Los síntomas clínicos que presentan son: fiebre, dolor de cabeza, erupción cutánea y formación de escoriaciones en el sitio de la picadura (Sarih, *et al.*, 2008)

El patógeno sobrevive poco tiempo fuera del huésped, mide de 0.8 a 2 micras de largo, con un diámetro de 0.3 a 0.5 micras y tiene una pared celular formada por peptidoglicano y lipopolisacáridos. La infección causada por rickettsias en las garrapatas es sistémica; se multiplican en el citoplasma del intestino, los ovarios, las glándulas salivales, los tubos de Malpighi y en la hemolinfa del ectoparásito. Muchas garrapatas son conocidas como vectores de *R. rickettsia* en el mundo. En Estados Unidos es causante de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas y en Brasil es el agente causal de la fiebre Maculosa (Labruna y Pereira, 2001).

Hoskins (1991) ubica a *R. sanguineus* de la siguiente manera:

#### **NIVEL / UBICACIÓN**

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Chelicerata

Clase: Arachnida

Orden: Acarina

Grupo: Parasitiformes

Suborden: Ixodoidea

Familia: Ixodidae

Género: *Rhipicephalus*

Especie: *R. sanguineus* Latreille

Esta garrapata originaria de África es conocida comúnmente como "garrapata café del perro" siendo introducida al entorno urbano por el perro doméstico, considerado su principal hospedero. Es importante destacar que es la única especie de garrapata que se considera como "plaga urbana", ya que parasita a los perros en las zonas urbanas y rurales (Labruna y Pereira, 2001).

La garrapata *R. sanguineus* tiene una distribución cosmopolita, en América ha sido reportada en Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Brasil, Colombia y Argentina. En Brasil, los vectores conocidos son *Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum* y los estudios recientes señalan a *R. sanguineus* como posible vector de *R. rickettsii* en humanos (Da Silva *et al.*, 2011).

En México la garrapata café del perro está reportada como vector de la Fiebre manchada en los estados de: Mexicali (B. C.), Culiacán y El Fuerte (Sin.) y Cuernavaca, Morelos (Tinoco *et al.*, 2007). Estudios recientes realizados en Mexicali (B. C.), arrojaron que el 98% (28/30) de los perros muestreados fueron seropositivos a *Ehrlichia canis* y el 16.6% (5/30) a *Rickettsia rickettsii* (Romano *et al.*, 1998).

En el municipio de Torreón (Coah.) De Lara y Cárdenas (2008) reportan 115 casos de fiebre manchada de pacientes que fueron atendidos en el Hospital Infantil. En los municipios de San Pedro y Fco. I. Madero, (Coah.) también se han presentado varios casos positivos y la población rural esta 1.45 veces más expuesta a contraer la fiebre manchada que en las zonas conurbadas (Covarrubias *et al.*, 2007).

#### Procedimiento Experimental

#### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

##### **Área de estudio:**

Se realizarán colectas al azar en los ejidos: Ana, La Unión (Torreón, Coah.), El Cambio y La Atalaya (Matamoros, Coah.).

##### **Colecta:**

Se colectarán 50 garrapatas adultas en cada localidad (200 muestras en total) utilizando una pinza para retirar el espécimen del perro.

Para coleccionar las garrapatas en la vegetación se empleará el método de barrido o bandera (Tick Drag).

Las muestras se etiquetarán por zona, área o sector y se depositará una garrapata por microtubo de 1.5 ml con etanol al 96%.

##### **I. Extracción de ADN:**

La extracción de ADN se realizará siguiendo el protocolo del kit Rapid Bacteria Genomic DNA Isolation (Bio Basic Inc.)

## II. Amplificación del gen de la proteína 17 KDa.

Se realizara un PCR utilizando un par de cebadores (primers) oligonucleótidos que amplifican una región de aproximadamente 434 pb del gen rickettsial que codifica la proteína 17 KDa común para todas las especies de rickettsias:

Fw 1: 5'- GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3'

Rv 2: 5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3'

1. Tomar aproximadamente 150 ng de ADN purificado y cuantificado.
2. Adicionar 0.3 µl de Taq ADN Polimerasa con 1.5 unidades de enzima.
3. Adicionar 5µl del reactivo Taq 10XPCR para obtener una concentración final de 1x, 1.5 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub> para obtener una concentración final de 1.5mM, 1µl de mezcla de Nucleótidos 10mM y 0.5 µl de cada cebador (primer) cuyas concentraciones iniciales son de 10 µl y en la mezcla será de 0.2 µM.
4. Adicionar agua estéril hasta llegar a un volumen final de 50 µl.
5. Correr la reacción con un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos.
6. Para alineamiento poner a 58 °C por 45 segundos.
7. Para la extensión poner a 72 °C por 60 segundos.
8. Al término de los 35 ciclos realizar un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

Para las condiciones de ciclado del PCR ejecutarlas en un Termociclador (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400).

## III. Controles Positivos y Negativos.

Adicionar a la prueba un control negativo haciendo una reacción con las concentraciones mencionadas para la prueba, con la excepción de que en lugar de ADN se adicionará agua. El control positivo consiste en hacer una reacción adicionando una muestra Rickettsial disponible.

## IV. Electroforesis

1. Tomar 10 µl de producto amplificado y resolver por electroforesis en gel de agarosa a 1.5x en TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1%.
2. Teñir el gel con Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml y observarlo en un trasluminador de luz ultravioleta (UV).

El marcador de peso molecular a utilizarse debe ser de 100 pbs.

Cronograma de actividades.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Revisión de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Colecta de especímenes	X	X	X	X								
Identificación de garrapatas.			X	X	X							
Extracción de ADN.					X	X						
Análisis de muestras (PCR) en el laboratorio.					X	X	X	X	X			
Obtención de resultados.					X	X	X	X	X	X	X	
Análisis de resultados									X	X	X	
Escritura de tesis y artículos											X	X

5.-Productos esperados

1. Una Tesis de maestría en ciencias
2. Publicación de un artículo científico.
3. Stock de ADN de *R. rickettsii*.

## 6.-Literatura citada

---

- Bustamante, M., G. Varela y C. Mariotte. 1946. Estudios de fiebre manchada en México. Fiebre manchada en La Laguna. Revista Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales 7: 39-48.
- Covarrubias, J., J. Zavala y J. Vásquez. 2007. Frecuencia de anticuerpos rickettsiales de fiebre Manchada en pacientes febriles de los municipios San Pedro de las Colonias y Francisco I. Madero, Coahuila, México. Revista Chapingo Serie Zonas Aridas 6:9-16.
- De Lara, J. y R. Cárdenas. 2008. Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en pediatría Revisión clínica de una serie de 115 casos. Revista de Enfermedades Infecciosas y Pediatría 22 (85): 4-9.
- Friedhoff, T. 1990. Interaction between parasite and tick vector. International Journal for Parasitology 20 (4): 525-535.
- Harwood, R. & M. James. 1993. Entomología médica y veterinaria. 7ª edición. Edit Limusa. México, DF. pp 429-480.
- Hoogstraal, H. 1978. Biology of ticks. Tropical Medicine Veterinary 10: 3-12.
- Hoskins, J. D. 1991. Ixodid and Argasid Ticks, Keys to Their Identification, in the Veterinary Clinics of North America; Small Animal Practice, Ed. Hoskins JD, USA 21:1.
- Jittapalapong, S., W. Stich, C. Gordon, E. Wittum & O. Barriga. 2000. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. Journal of Medical Entomology 37(4): 601-611.
- Klompen, S., C. Black, E. Keirans & E. Norris. 2000. Systematics and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. Cladistics 16: 79-102.
- Kollars, M. 1996. Interspecific differences between small mammals as host of immature *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and a model for detection of high risk areas of Rock Mountain Spotted Fever. Journal of Parasitology 82(5): 707-710.
- Labruna, M. y M. Pereira. 2001: Carrapatos em cães no Brasil. Revista Clínica Veterinaria 30(1):24-32.
- Lavender, A., L. Musisi, W. Mfitilodze, K. Tjørnehoj, P. Whiteland, T. Kafuwa & E. Chamambala. 1996. Integrated tick and Tick-borne disease control trials in crossbred dairy cattle in Malawi. Tropical Animal Health & Production 28(4): 280-288.
- Manjula, K. & R. Rao. 1996. What Makes a Cell Tick – The A, B, C, of the matter. Current Science 70 (6): 441- 445.
- Márquez, F., A. Hidalgo, F. Contreras, J. Rodríguez y M. Muniain. 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 23 (2): 94-102.
- McKenzie, E. 1998. Largest Blood Meal. University of Florida, Book of Insect Records, Chapter 31, Department of Entomology & Nematology. University of Florida, USA 32611-0620. pp 76-79.
- Pereira, D., P. Szabo, H. Bechara, R. Matushima, M. Duarte, Y. Rechav, L. Fielden & E. Keirans. 2000. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal región of Brazil. Journal of Medical Entomology 37 (6): 979-983.
- Quintero, M., S. Gaxiola, A. Castillo y G. Juárez. 2004. Algunas consideraciones sobre la presencia de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (Acari; Ixodide) sobre perros y su repercusión en salud. Entom. Mex. 3: 86-88.
- Ribeiro, M. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Annual Review of Entomology 32(1): 463.
-

- Romano, M., L. Tinoco y F. Covarrubias. 1998. Demostración de *Ehrlichia canis* mediante el método de ELISA en la ciudad de Mexicali, B.C. Revista de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies (AMMVEPE) 9:86.
- Sarih, M., C. Socolovschi, N. Boudebouch, M. Hassar, D. Raoult & P. Parola. 2008. Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks, Morocco, Emerging Infectious Diseases 14(7): 1067-1068.
- Spach, H., C. Liles, L. Campbell, E. Quick, E. Anderson & R. Fritsche. 1993. Tick-borne Diseases in the United States. N. Engl. J. Med 329: 936-947.
- Stackebrandt, E., W. Ludwig, G. Fox. 1986. 16S ribosomal RNA oligonucleotide catalogues. In: Gottschalk G (ed) Methods in microbiology. Vol 18. Academic Press, New York, EUA. Pp 78-108.
- Tinoco, L., H. Quiroz, M. Quintero, T. Rentería, Y. González, A. Barreras, S. Hori, M. Moró & J. Vinasco. 2007. Prevalence of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in dogs from an urban Mexico-U.S. border region: a pilot study. Journal of Animal and Veterinary Advances 6 (6):787-789.
- Da Silva, L., P. Nunes, J. Soares, M. Labruna and M. Camargo-Mathias. 2011. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). Parasites & vectors 4:222.
-