

International Journal of **Biological and Natural Sciences**

RICKETTSIOSIS POR INMUNO- FLUORESCENCIA INDIRECTA Y POR PCR EN TIEMPO REAL

Aurora Martínez Romero

Doctora en Ciencias Agropecuarias por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio Durango, México

José Luis Ortega Sánchez

Doctor en Educación por la Universidad Autónoma de Coahuila. Institución: Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas Bermejillo, Durango

Sara Linnet Luna Reyes

Química Farmacéutica Bióloga por la Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio Durango, México

Maribel Cervantes-Flores

Doctora en Inmunología por la Universidad Nacional Autónoma de México. Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Durango Durango, México.

José de Jesús Alba-Romero

Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Juárez del Estado de Durango Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Gómez Palacio Durango, México.

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



Resumen: La rickettsiosis es la enfermedad transmitida por mordedura de garrapata y tarda en incubarse de 10 a 12 días luego de su exposición. Puede llegar a convertirse en un mal grave y puede ser mortal. El objetivo fue desarrollar la técnica de Inmunofluorescencia indirecta IgM para rickettsiosis y RT-PCR en tiempo real para identificar la presencia de ADN rickettsial en individuos infectados en la ciudad de Chihuahua. Estudio transversal, analítico, observacional. Muestra de 187 individuos con sintomatología característica de rickettsiosis. Se colectaron de manera directa muestras de sangre de individuos infectados, las muestras se llevaron para su análisis al laboratorio de referencia del Centro de Salud de la ciudad de Chihuahua. Se procedió al llenado de una encuesta y toma de muestra sanguínea para realizar extracción y purificación de ADN se realizó mediante el protocolo Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Para pruebas de PCR se utilizó el primer que amplifica el gen *gltA* en un rango de 380-397 pb. Bajo las condiciones estandarizadas del termociclador Select Cyler II (Select BioProducts®, USA). El marcador de peso molecular (Hyperladder 100-pb – Bioline®, USA), control positivo y productos obtenidos de PCR fueron teñidos con Gel Red (Biotium TM, USA) y observados en gel de agarosa 1%; para visualizar los resultados de productos se empleó fotodocumentador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems®). Prueba de IFI con objetivo 40x (LEICA DMLS®). Se determinó la asociación entre los factores relacionados a la presencia de la enfermedad, los OR así como los Riesgos Relativos, IC 95%. De 187 muestras sanguíneas procesadas por PCR se obtuvieron 55 positivas (29.4%). Los anticuerpos IgM por IFI se detectaron en suero de 7 a 10 días de iniciados los síntomas con un total de 55 positivas, correlación del 100% entre métodos. Se analizó la

asociación de factores que podrían estar relacionados a rickettsiosis en afectados. Las manifestaciones clínicas (lesiones) presentadas fueron petequias, piel moteada, eritematoso y macular, costra, equimosis, erupción maculosa y petequial, exantema, maculo papular y pústulas. No existe efecto de ningún factor en la regresión logística, inicio de síntomas y días de evolución, los demás factores están muy distanciados de la probabilidad 0.05 asociados a la presencia de rickettsiosis edad (8 meses a 73 años). Valores de disparidad e intervalo de confianza son muy cercanos a uno. La prueba IFI IgM podría ser aplicada en el diagnóstico de Rickettsiosis para estudios epidemiológicos y la PCR en tiempo real para detectar la presencia de ADN rickettsial en individuos infectados.

Palabras clave: Reservorio, rickettsiosis, vector, zoonosis, tifus, inmunofluorescencia, PCR.

INTRODUCCIÓN

Las rickettsiosis son afecciones de distribución mundial provocadas por diferentes especies de *Rickettsia*; tales como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, del Mediterráneo y tifus, entre otras. Presentan entre sí similitudes desde el punto de vista clínico con la aparición de exantema y equimosis, su epidemiología ha estado siempre ligada a un círculo formado por la interacción reservorio-artrópodo, vector-hombre. Transmitida por mordedura de garrapata y tiempo de incubación de 10 a 12 días. Rickettsiosis se diagnostica con el método reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Venzal, Estrada-Pena, et al. 2012; Reeves, Durden, et al. 2015) asociada con inmunohistoquímica.

La rickettsiosis abarca un grupo de enfermedades infecciosas causadas por al menos ocho especies de bacterias del género

Rickettsia y que se asocian a malas condiciones higiénicas debido a que se transmiten por vectores, principalmente garrapatas (Secretaría de Salud, 2016). La rickettsiosis es la enfermedad transmitida por mordedura de garrapata y tarda en incubarse de 10 a 12 días luego de su exposición. Puede llegar a convertirse en un mal grave y puede ser mortal. La Rickettsiosis es un grupo de enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia* y que presentan entre sí similitudes desde el punto de vista clínico, en México se presenta la enfermedad en prácticamente todo el país (Martínez, 2015).

Las rickettsiosis son entidades clínicas de tipo zoonótico, causadas por bacterias intracelulares estrictas de los géneros *Rickettsia* y *Orientia*, pertenecientes a la familia *Rickettsiaceae* (Hidalgo, 2013). Las bacterias del género *Rickettsia* son responsables de un gran número de enfermedades de importancia, tal como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, la fiebre manchada del Mediterráneo y tífus, entre otras (Zavala, 2004).

Fiebre manchada, Fiebre manchada de las Montañas Rocosas, causada por *Rickettsia rickettsii* transmitida por garrapatas (géneros – *Dermacentor*, *Amblyomma* y *Rhipicephalus*), con reservorio en perros y roedores silvestres. *Rickettsia* de Norasia, Tífus por garrapata de África, Tífus de garrapata de Queensland, *Rickettsia pustulosa* Fiebre Q, causado por *Coxiella burnetii*. Sus reservorios son bovinos, ovinos, caprinos y roedores. Fiebre de las Trincheras, causado por *Rickettsia* Quintana por *Pediculus humanus*, var. *corporis*. Su ciclo endémico es hombre – piojo – hombre. La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas es una enfermedad reemergente en la Comarca Lagunera, ya que en los últimos años se han reportado numerosos casos en pacientes humanos (Castillo-Martínez y Valdes-Perezgasga 2017).

Las rickettsiosis transmitidas por garrapatas son causadas por bacterias intracelulares pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas del género *Rickettsia*. Estas zoonosis son algunas de las enfermedades transmitidas por vectores de más antiguo conocimiento, e incluyen dentro de su ciclo de transmisión diversas especies de mamíferos. No obstante, en Colombia existen pocos trabajos enfocados a conocer la dinámica de las rickettsiosis en animales silvestres. El objetivo de este estudio fue detectar, por medio de la técnica de PCR en tiempo real, la presencia de *Rickettsia* spp en muestras de suero y garrapatas colectadas en mamíferos mantenidos en cautiverio en el Centro de Atención y Valoración de Fauna Silvestre de la Corporación autónoma Regional de los Valles del Sinú y San Jorge CAV-CVS, entre los años 2009 y 2014 (Wehdeking-Hernández, et al. 2014).

En el municipio de Matamoros, Coahuila existen viviendas construidas de adobe con piso de tierra y los habitantes conviven con gran cantidad de perros (NOM-EM-001-SSA2 1999). En 1945, se notificaron casos humanos positivos a fiebre manchada en el Ejido Jimulco (Torreón, Coah.), en 1946 se aislaron dos cepas de *Rickettsia* en garrapatas *R. sanguineus* provenientes del Ejido Granada (Matamoros, Coahuila) y del Ejido Zaragoza (Torreón, Coahuila) (Castillo-Martínez, et al. 2015).

A partir de 2009 se incrementa en México el registro de casos por asociación clínico-epidemiológica de rickettsiosis en el Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades Sujetas a Vigilancia Epidemiológica, conocido por el acrónimo de su herramienta de captura, el Sistema Único Automatizado para la Vigilancia Epidemiológica (SUAVE), con 976 casos, al año siguiente se reduce a 614, para nuevamente incrementarse a 741 y 782 en

2012, estos casos suman 3,113 de los cuales el 87% corresponde a fiebre manchada de las montañas rocosas y el resto a los tifos murino y epidémico (Ajantha, et al. 2013).

Los 782 casos registrados en el SUAVE en 2012, se distribuyen en 17 entidades de mayor a menor número: Baja California (254), Nuevo León (129), Baja California Sur (85), Sonora (82), Coahuila (75), Sinaloa (58), Hidalgo (31), Quintana Roo (18), Michoacán (15), Guanajuato (12), Chihuahua (6), San Luis Potosí (5), Colima (4), Morelos (3), México (2), Zacatecas (2) y Aguascalientes (1).

Por otra parte, el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), en los mismos años informa haber encontrado como muestras positivas 8,554, por el número de positividad se ha incrementado, en 2009 fueron 974, el año siguiente 1,944, para 2011 se incrementó a 2,771 y en 2012 notifica 2,865 muestras positivas. En 2012 con excepción del Estado de Tlaxcala, el resto se identifica muestras positivas.

De las 2,865 muestras reportadas como positivas por el InDRE en 2012, se distribuyen en todo el territorio nacional, teniendo alta incidencia principalmente en los Estados de Nuevo León (615), Sinaloa (472), Coahuila (444), Michoacán (350) y Baja California Sur (233), Hidalgo (76), Veracruz (72), Morelos (68), Colima (63) y Sonora (62). En cuanto a las defunciones a consecuencia de estas patologías, en los años de 2010 y 2011 se reportan 38 defunciones principalmente en los Estados de Baja California, Coahuila, Sinaloa y Sonora, afectando mayormente a los grupos de edad de entre 5-14 años, seguidos por 1-4 años y 25-44 años de forma predominante (Ajantha, 2013).

Durante el 2018, en el estado se presentaron 21 defunciones por esta enfermedad, siendo la ciudad de Chihuahua la que registró el mayor número de casos con 15, la mayoría de ellos en colonias del

oriente de la mancha urbana (Silva, 2019). Las especies de *Rickettsia* spp de interés médico han sido clasificadas en 2 grupos: grupo tifus, que incluye a *Rickettsia typhi* y *Rickettsia prowazekii* cuyos vectores son pulgas y piojos, respectivamente; y grupo de las fiebres manchadas, que incluye más de 20 especies y tienen como principales vectores a las garrapatas duras de la familia Ixodidae (Armitano, 2019).

El Estado de Chihuahua y la Comarca Lagunera son zonas previamente identificadas como endémicas tifo, por lo que el agente etiológico presente en esta zona es *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*, teniendo como artrópodos a las pulgas y garrapatas. Sin embargo, la zona de estudio por ser ganadera es posible encontrar diferentes tipos de especies de garrapata, dentro de ellas la que transmite la *Rickettsia prowazekii* y la *Rickettsia typhi*, las cuales son vectores de una gran variedad de enfermedades mejor conocidas como fiebres manchadas.

Las rickettsiosis, o enfermedades provocadas por *Rickettsia* spp constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución mundial transmitidas por artrópodos vectores que tienen un carácter emergente y reemergente. Por haberse reportado recientemente, brotes de rickettsiosis en la ciudad de Chihuahua, es importante realizar un diagnóstico específico en la búsqueda del patógeno en los individuos afectados. Actualmente, existe una incidencia de esta enfermedad a partir del 2016 hasta la actualidad afectando a toda la población, donde se han involucrado municipios como Torreón, Matamoros, Gómez; Nazareno, Juárez y Chihuahua.

A raíz de los casos documentados, se dio un aviso epidemiológico de brote por parte de la Dirección General de Epidemiología 2013-2018 para poner énfasis en el diagnóstico y detección oportuna de casos. Desde esa fecha

y hasta la actualidad se siguen presentando casos de fiebre manchada por *R. rickettsii* de forma endémica en el Norte del país. En este estudio se presenta una serie de casos detectados con rickettsiosis. El objetivo de la presente investigación fue identificar por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) IgM para rickettsiosis y la presencia de ADN rickettsial por RT-PCR en tiempo real en individuos infectados en la ciudad de Chihuahua.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal, analítico, observacional. Muestra de 187 individuos con sintomatología característica de rickettsiosis, se procedió al llenado de una encuesta y toma de muestra sanguínea para realizar extracción de ADN se realizó mediante el protocolo Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Para pruebas de PCR se utilizó el *primer* que amplifica el gen *gltA* en un rango de 380-397 pb. Bajo las condiciones estandarizadas del termociclador Select Cycler II (Select BioProducts®, USA). a 65 °C durante 30 min; posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo frío (C4425-12, Jalmek®) y se mezclaron por 10 seg en el vortex. Las muestras se colocaron en una centrífuga (Force micro 1624, Select Bioproducts® U.S.A.) durante 20 min a 13000 rpm, se transfirieron 120 µl de la fase acuosa a microtubos estériles de 1.5 ml, a las cuales se les adicionaron 200 µl de isopropanol frío (P6925-13, Jalmek®) y se dejaron reposar durante 30 min a -30 °C para precipitar los ácidos nucleicos. Las muestras nuevamente se centrifugaron durante 20 min a 13000 rpm, se decantó el isopropanol para agregar 200 µl de etanol frío (E5325-15, Jalmek®) al 70%, se realizó otra centrifugación por 10 min a 13 000 rpm; se decantó el etanol dejando secar la pastilla a temperatura ambiente durante 40 min y finalmente se resuspendió el ADN

en 30 µl de agua milli-Q (Life Invitrogen®, USA). Pruebas Moleculares. La calidad y cantidad de ADN obtenido por medio de nanodrop (Thermo Scientific® NanoDrop 2000) fue evaluada, resuspendiéndola en 20 µl de buffer TE 1X [400 µl EDTA (Life Invitrogen®, USA) + 4 ml Tris Base (Bio Basic Canada Inc®)] para almacenarla a -20 °C. Para las pruebas de PCR se utilizó el iniciador genérico que amplifica el gen *gltA* en un rango de 380-397 pb (Wood et al., 1987) para *Rickettsia* spp: Forward: RpCS.877p GGGGGCCTGCTCACGGCGG, Reverse: RpCS.1258n ATTGCAAAAAGTACAGTGA ACA (Regnery et al., 1991). La reacción de PCR se realizó con la siguiente mezcla de reacción: MgCl₂ a una concentración de 1.5 mM, buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4 Bio Basic Canada Inc®), dNTP's (Life Invitrogen®, USA) a una concentración de 0.2 mM, 1.25 U de Taq DNA polimerasa (Life Invitrogen®, USA), ADN templado concentrado a 20-25 ng/µl, 20 pmol/ µl de cada uno de los iniciadores (RpCS.877p, RpCS.1258n) y agua milli-Q (Life Invitrogen®, USA) para completar un Rx de 25 µl (Castillo-Martinez y Valdes-Perezgasga 2017).

Las condiciones del termociclador Select Cycler II (Select BioProducts®, USA) para amplificar el gen *gltA* fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C durante un minuto, 35 ciclos conformados por tres procesos: desnaturalización a 95 °C (20 segundos), alineación de iniciadores a 48 °C por 30 segundos, una extensión a 60 °C (2 minutos) y otra extensión final a 72 °C (1 min). Como control positivo se utilizó una muestra de *Rickettsia rickettsii* y una mezcla sin ADN para el control negativo. El marcador de peso molecular (Hyperladder 100-pb – Bioline®, USA), el control positivo y los productos obtenidos de PCR fueron teñidos con Gel Red (Biotium TM, USA) y observados en gel de agarosa al 1%; para visualizar los

resultados de los productos se empleó un fotodocumentador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems®) (Castillo-Martinez y Valdes-Perezgasga 2017).

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta IgM: Descongelar las láminas 30 min antes de realizar la prueba. Diluir el suero del paciente en buffer PBS 1:4, tomar un volumen de ésta dilución y diluir 1:4 con el reactivo Diluyente IgM PreTreatment (FOCUS), incubar a temperatura ambiente por 15min, centrifugar y diluir 1:4 con PBS + skim milk 3% y agregar 10ul del suero diluido a cada círculo de la lámina e incubar en cámara húmeda a 37 °C por 30min. Retirar las láminas de la cámara húmeda y lavar 3 veces con PBS pH 7.2 por 10 minutos cada vez, dejar secar a temperatura ambiente o por 5 min. a 37°C, una vez seco agregar 10µL del conjugado (diluido 1:10) por cada círculo de la lámina incubar por 30min en cámara húmeda a 37°C. Retirar las láminas de la cámara húmeda y lavar 3 veces con PBS pH 7.2 por minutos cada vez. Dejar secar y realizar el montaje para observar al microscopio de inmunofluorescencia con objetivo 40x (LEICA DMLS). Prueba de IFI con objetivo 40x (LEICA DMLS®). Se determinó la asociación entre los factores relacionados a la presencia de la enfermedad, los OR así como los Riesgos Relativos, IC 95% la determinación mediante el GENMOD

la asociación de factores que podrían estar relacionados a la presencia de enfermedad en los encuestados y la regresión Logística Binaria para las características cuantitativas asociadas a la enfermedad. Así como, las tablas de frecuencias descriptivas para las características relacionadas con los resultados de rickettsias.

RESULTADOS

De 187 muestras sanguíneas procesadas por PCR se obtuvieron 55 positivas (29.4%). Los anticuerpos IgM por IFI se detectaron en suero de 7 a 10 días de iniciados los síntomas con un total de 55 positivas, correlación del 100% entre métodos. Se analizó la asociación de factores que podrían estar relacionados a rickettsiosis en afectados (**Tabla 1**). Las manifestaciones clínicas (lesiones) presentadas fueron Petequias, piel moteada, eritematoso y macular, costra, equimosis, erupción maculosa y petequeal, exantema, maculo papular y pústulas.

No existe efecto de ningún factor en la regresión logística, inicio de síntomas y días de evolución, los demás factores están muy distanciados de la probabilidad 0.05 asociados a la presencia de rickettsiosis edad (8 meses a 73 años). Valores de disparidad e intervalo de confianza son muy cercanos a uno (**Tabla 2**).

| Factor | Frecuencia | % | Chi-cuadrada | OR IC 95% | Límites de confianza al 95% | | |
|-------------------------|----------------------|-------|--------------|--------------|--------------------------------|--------|-----|
| Viajes | 26 | 16.88 | 0.2192 | 0.5238 | 0.1843 | 1.4886 | NS* |
| Exposición con vectores | No expuesto/expuesto | 97/44 | 0.1807 | 0.9604 | 0.9231 | 0.9992 | NS* |
| Genero | Fem 132/Masc 55 | | 0.4959 | 1.2444 | 0.6628 | 2.3365 | NS* |
| Lesiones | Con/sin | 89/47 | 0.6525 | 1.3202 | 0.3928 | 4.4371 | NS* |

*Chi-cuadrada > 0.05 (NS); IC = 1 (NS), IC 95%

Tabla 1. Análisis de asociación entre factores relacionados con la enfermedad.

| Efecto | Estimador | Error estándar | Chi-cuadrado | P>Chi ² | Estimador del punto | Límites de confianza al 95% | |
|-------------------|-----------|----------------|--------------|--------------------|---------------------|-----------------------------|-------|
| Edad | 0.0129 | 0.0109 | 1.3870 | 0.2389 | 1.013 | 0.991 | 1.035 |
| Mes inicial | -0.1327 | 0.0721 | 3.3871 | 0.0657 | 0.876 | 0.760 | 1.009 |
| Días de evolución | 0.1187 | 0.0698 | 2.8943 | 0.0889 | 1.126 | 0.982 | 1.291 |

Tabla 2. Análisis del estimador de máxima verosimilitud y estimadores de cocientes de disparidad.

DISCUSIÓN

El objetivo de la presente investigación fue implementar y validar la técnica de Inmunofluorescencia indirecta IgM para rickettsiosis y RT-PCR en tiempo real para identificar la presencia de ADN rickettsial en individuos infectados en la ciudad de Chihuahua.

En los últimos años el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular ha estado aportando un gran avance en el diagnóstico de las rickettsiosis alrededor de todo el mundo. Así, la reacción de PCR y la posterior secuenciación de los fragmentos genéticos amplificados constituyen en la actualidad una herramienta útil para la detección e identificación de *Rickettsia* spp en la zona de Chihuahua, Comarca Lagunera, entre otras. Este aporte ha permitido el descubrimiento de nuevas especies de *Rickettsia* y su implicación en patología humana. Entre las dianas de PCR utilizadas para el diagnóstico de las infecciones por *Rickettsia* spp, se encuentra el gen que codifica la subunidad 168 del ARN ribosomal y los genes que modifican las proteínas citrato sintasa (GltA), rOmpA, rOmpB y una proteína antigénica de J7KDa. Estos genes están ampliamente estudiados por diferentes autores que hablan de rickettsiosis pero estos desconocían cual era realmente su sensibilidad y validez para la identificación de especies *Rickettsia* en nuestro ambiente (Choi et al., 2005).

Asimismo, se ha diagnosticado la presencia de *Rickettsia* spp con la PCR realizando

secuenciación y análisis filogenético (Venzal et al. 2012).

En este trabajo se ha encontrado que la combinación de reacciones de IFI como PCR secuenciales logra la detección de *Rickettsia* al 100% de las muestras seleccionadas para ser estudiadas. Estas reacciones de PCR se han utilizado para el diagnóstico molecular de rickettsiosis y para identificar nuevas especies de *Rickettsia* en diferentes cuadros clínicos. De la misma manera Rauch y colaboradores (2018) realizaron el diagnóstico de rickettsiosis con el ensayo de IFI y PCR cuantitativa, con el ensayo IFI trabajaron con muestras de suero que indicaron la seroconversión simultánea de IgM, IgA e IgG; con la reacción PCR cuantitativa determinaron la secuencia del genoma de *R. tyhi* siendo el agente causal más común.

En nuestro estudio se detectaron en suero los anticuerpos IgM por IFI después de 7 a 10 días de iniciados los síntomas con un total de 55 positivas. De la misma manera con el ensayo de IFI (Rauch et al., 2018), utilizaron la cepa de *R. conorii* en cultivo celular de fibroblastos resultando los valores de <20 (IgM e IgA) y <40 (IgG e Ig total).

De las reacciones de PCR simples utilizadas en este trabajo, la que utiliza como diana el extremo 5' del gen GltA, ha sido la que más ha ofrecido resultados de sensibilidad, ya que permitió detectar *Rickettsia* spp en el 29.4% y en los anticuerpos IgM por IFI el 34% en las 187 muestras analizadas, estas reacciones se diseñaron para detectar la presencia de

R. rickettsii en humanos en asociación a la garrapata con cierta infección. En otro trabajo realizado en el año 2012 por Venzal y colaboradores se detectó también el gen *GltA* y el *OmpA* de *Rickettsia* spp.

En los últimos años han sido varios los trabajos publicados en los que se han usado reacciones de PCR a tiempo real e Inmunofluorescencia para el diagnóstico de rickettsiosis en humanos. Recientemente, se han estado publicando trabajos en que hablan detalladamente el uso de PCR cuantitativa e IFI para el diagnóstico molecular de rickettsiosis.

Muchos autores confirman que no hay un rango de edad para verse afectados por la *Rickettsia* spp, todas las personas están expuestas a esta enfermedad. En el caso de Chihuahua la población que se tomo fue de 187 personas donde existen factores que indican que las personas pueden ser afectadas desde los 8 meses hasta los 73 años.

La prueba IFI IgM podría ser aplicada en el diagnóstico de Rickettsiosis para estudios epidemiológicos y la PCR en tiempo real para detectar la presencia de ADN rickettsial en individuos infectados.

REFERENCIAS

- Ajantha, G. S., Patil, S. S., Chitharagi, V. B. (2013). Rickettsiosis: A cause of acute febrile illness and value of Weil-Felix test. *Indian Journal of Public Health*, 57(3), 182-183.
- Armitano, R. I., Guillemi, E., Escalada, V., Govedic, F., Lopez, J. L., Farber, M., Borrás, P., Prieto, M. (2019). Fiebre manchada en Argentina. Descripción de dos casos clínicos. *Rev Argent Microbiol*, 51(4), 339-344.
- Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S. M., Hernández-Rodríguez, S., Gallegos-Robles, M. A., Valdes-Perezgasga, M. T., Sánchez-Ramos, F. J., & Ortega-Morales, A. I. (2015). Detección de *Rickettsia* sp. en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Matamoros, Coahuila, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 31(1), 80-83.
- Castillo-Martínez, A., Cueto-Medina, S. M., Valdes-Perezgasga, M. T., Sánchez-Ramos, F. J., López-Hernández, J., Hernández-Rodríguez, S., Ortega-Morales, A. I. (2017). Detección de *Rickettsia rickettsii* brumpt (RICKETTSIALES: RICKETTSIACEAE) en la garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* latreille (IXODIDA: IXODIDAE) en la Comarca Lagunera, zona reemergente de fiebre manchada en México. *Acta Zoológica Mexicana*, 33(2), 6.
- Choi, Y. J., Lee, S. H., Park, K. H., Koh, Y. S., Lee, K.-H., Baik, H. S., Choi, M. S., Kim, I. S., Jang, W. J. (2005). Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(6), 759-763.
- Hidalgo, M., Faccini-Martínez, Á. A., Valbuena, G. (2013). Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. *Biomedica*, 33, (Supl.1):161-78
- Martínez, B.M. (2015). Lineamientos para la vigilancia epidemiológica. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 4.

Rauch, J., Eisermann, P., Noack, B., Mehlhoop, U., Muntau, B., Schäfer, J., Tappe, D. (2018). Typhus group rickettsiosis, Germany, 2010–2017. *Emerging infectious diseases*, 24(7), 1213.

Reeves, W. K., Durden, L. A., Iwakami, M., Vince, K. J., Paul, R. R. (2015). Rickettsial diseases and ectoparasites from military bases in Japan. *Journal of Parasitology*, 101(2), 150-156.

Secretaría de Salud. (2016). Rickettsia una enfermedad poco conocida que rara vez se relaciona con las picaduras. <https://www.gob.mx/salud/articulos/rickettsia-una-enfermedad-poco-conocida-que-rara-vez-se-relaciona-con-las-picaduras>

Venzal, J. M., Estrada-Pena, A., Portillo, A., Mangold, A. J., Castro, O., De Souza, C. G., Félix, M. L., Pérez-Martínez, L., Santibáñez, S., Oteo, J. A. (2012). *Rickettsia parkeri*: a Rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54(3): 131-134.

Zavala, C. J., Ruiz, S. A., Zavala, V. J. (2004). Las Rickettsias del grupo de las fiebres manchadas: Respuesta inmune y sus proteínas inmunodominantes. *Rev Méd Chile*, 132, 381-387.