

Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos de Ensenada, Baja California, México

Jorge Field-Cortazares^{1*}, Angélica María Escárcega-Ávila², Gilberto López-Valencia², Alberto Barreras-Serrano² y Luis Tinoco-Gracia²

¹Departamento de Pediatría e Infectología, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California;

²Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California

Resumen

Introducción: En México la rickettsiosis causada por *R. rickettsii* (bacteria intracelular obligada) es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* y es capaz de infectar a vertebrados, incluidos los seres humanos. Los síntomas son: fiebre alta, cefalea, mialgia, náusea, vómito, dolor abdominal y tos. La mortalidad puede ser de hasta el 30% en pacientes no tratados. **Objetivos:** Demostrar que existe rickettsiosis en Ensenada, Baja California (México), porque no hay casos reportados en seres humanos. **Materiales y métodos:** El presente estudio, prospectivo, descriptivo, seccional y cruzado, fue efectuado en el lapso comprendido entre octubre de 2009 y agosto de 2011 e incluyó 384 muestras de pacientes mayores de un año de edad de Ensenada (Baja California). Los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit *R. rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., de uso en perros y adaptado para humanos utilizando un conjugado antiinmunoglobulina G (anti-IgG) humana. Para determinar la sensibilidad y la especificidad en humanos se sometieron 32 muestras a IFA. Para el diagnóstico molecular de *R. rickettsii* en perros y garrapatas se utilizaron iniciadores específicos. **Resultados:** La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis por *R. rickettsii* en humanos fue del 3.9% (intervalo de confianza [IC] del 95%: 0.8-5.3) y la seropositividad no mostró sucesión con el sexo, la edad, la ocupación, la presencia de perros en el hogar, el programa de desparasitación de mascotas contra garrapatas, el tipo de patio y la movilidad de perros entre el hogar y la calle. **Conclusiones:** Del resultado de acuerdo sustancial de κ entre el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e IFA se deduce que los resultados de seroprevalencia de este trabajo son confiables.

PALABRAS CLAVE: Rickettsiosis. *Rickettsia rickettsii*. Zoonosis. Garrapata. Salud pública.

Abstract

Introduction: *Rickettsiosis* caused by *Rickettsia rickettsii* is capable of infecting vertebrates, including humans. The symptoms are high fever, headache, myalgia, nausea, vomiting, abdominal pain, and cough. Mortality can be up to 30% in untreated patients. **Aims:** To prove the existence of rickettsiosis in Ensenada, Baja California, Mexico, because no human cases have been reported. **Material and methods:** This observational, cross-sectional, descriptive study included 384 samples of humans in Ensenada, Baja California. Antibodies against *R. rickettsii* were measured with the kit *R. rickettsii* ELISA® Helica Biosystems,

Correspondencia:

*Jorge Field Cortazares
Departamento de Pediatría e Infectología
Universidad Autónoma de Baja California
Av. Reforma y Bulevar Sánchez Zertuche
Fracc. Valle Dorado, Ensenada, Baja California
E-mail: Jorge_field_c@hotmail.com

Fecha de recepción: 02-06-2014

Fecha de aceptación: 02-06-2014

Inc., adapted for use in humans using human IgG conjugate antibodies. To determine the sensitivity and specificity, 32 human samples were submitted to IFA. Specific primers were used for the molecular diagnosis of *R. rickettsii* in dogs and ticks. **Results:** The seroprevalence adjusted rickettsiosis in humans was 2.9% (95% CI: 0.8-5.3), seropositivity was not associated with sex, age, occupation, household, dogs, pet deworming program against ticks, the type of yard, and mobility of the dog between home and the street. **Conclusions:** With substantial agreement of κ between ELISA and IFA, it follows that the results of seroprevalence of this work are reliable. (Gac Med Mex. 2015;151:42-6)

Corresponding author: Jorge Field Cortazares, Jorge_field_c@hotmail.com

KEY WORDS: Rickettsiosis. Rickettsia rickettsii. Zoonosis. Tick. Public health.

Introducción

Las rickettsiosis, enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia*, constituyen un problema grave de salud pública a nivel mundial, porque pueden afectar a amplios sectores de la población, por la dificultad de su diagnóstico y por los desenlaces fatales cuando no existe una intervención temprana en el tratamiento^{1,2,8}. Existen 24 especies de rickettsias reconocidas, de las cuales 16 causan enfermedades rickettsiales. La mayoría de estas bacterias se asocian a garrapatas, que son sus vectores y reservorios, pero algunas son transmitidas por piojos, pulgas o ácaros; por lo tanto, la distribución geográfica de estas enfermedades depende de la distribución geográfica de sus vectores^{3,6,5,9}. Las rickettsias se dividen en dos grupos: grupo de las fiebres manchadas y grupo de las fiebres tíficas, según varias características. En el grupo de las fiebres manchadas se asocian como vectores principalmente las garrapatas (*R. rickettsii*, *R. japonica*, *R. conorii*), que transmiten la enfermedad de manera transovárica (a toda su progenie) y transestadialmente (en cualquier estadio), pero también las pulgas (*R. felis*) y los ácaros (*R. akari*)^{5,17,21}. El grupo de las fiebres tíficas está asociado con piojos (*R. prowasekii*) y pulgas (*R. typhi*), que tienen a los mamíferos como reservorio^{22,24,25}. Es difícil determinar cuál de estas bacterias es de mayor patogenicidad para el humano, pero *R. rickettsii* es la que causa más muertes al año^{1,27,29}. La fiebre manchada de las Montañas Rocosas es causada por *R. rickettsii*, bacteria intracelular obligada^{11,14}. Estas especies se asocian a artrópodos asociados a bacterias y son capaces de infectar a vertebrados, incluidos los humanos, generalmente como huéspedes accidentales. Son organismos cortos, de forma cocobacilar, gramnegativos, de 0.8-2.0 μm de longitud y 0.3-0.5 μm de diámetro². En EE.UU., los principales vectores de esta enfermedad son *Derma-centor andersoni*, en las Montañas Rocosas, y *D. variabilis*, en el este, la costa atlántica y la costa oeste.

En México, los principales vectores son *R. sanguineus* y *Amblyomma americanum*, al igual que en Centroamérica y Sudamérica².

Con base en lo anterior, se planteó el siguiente objetivo: estimar la seroprevalencia de rickettsiosis (*R. rickettsii*) en humanos y medir su asociación a factores de riesgo en Ensenada (Baja California).

Materiales y métodos

Diseño del estudio

El presente estudio, prospectivo, descriptivo, seccional y cruzado, incluyó 384 muestras de pacientes mayores de un año de edad que acudieron a uno de los tres laboratorios clínicos de diagnóstico privados de la zona urbana de Ensenada (Baja California) que participaron en el estudio. Los análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones y Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

Consideraciones éticas y criterios de inclusión

Este estudio cumplió con los lineamientos que en materia de investigación y ética se establecen en la Declaración de Helsinki (1964), revisada en Tokio (1975), Venecia (1983) y Hong Kong (1989). Participaron en el estudio pacientes mayores de un año, de ambos sexos, que acudieron al laboratorio clínico de diagnóstico por cualquier motivo. Fue requisito que los pacientes contaran con la carta de consentimiento informado y la autorización del padre o tutor cuando así lo requirió el caso.

Cálculo del tamaño de la muestra

La muestra se colectó aleatoriamente sin reemplazo. El valor de p estuvo incluido dentro de 1.96 ($p [1-p]/n$)^{1/2}

para π ; entonces, el tamaño de muestra (n) se obtuvo al aplicar la fórmula:

$$n = \pi (1 - \pi) \left[\frac{Z}{d} \right]^2$$

Donde: n = tamaño de muestra (384); π = estimador de la varianza máxima 50%; $Z = 1.96$, y $d = 5\%$.

Toma de muestras

El procedimiento para la toma, procesamiento, identificación y conservación de las muestras de sangre se realizó de la siguiente manera: se recolectaron al menos 2 ml de sangre en tubos vacíos sin etilendiaminotetraacético (EDTA) de 3 ml destinados para las pruebas serológicas, por punción venosa radial cubital, previa antisepsia de la región con alcohol isopropílico. Las muestras sanguíneas colectadas fueron identificadas con los números correspondientes al cuestionario aplicado a cada sujeto; las contenidas en tubos sin EDTA fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 min para obtener el suero para la realización de la prueba de ELISA e IFA. El suero obtenido de cada muestra fue depositado en contenedores de 1.5 ml de capacidad, identificado y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar las pruebas serológicas.

Análisis serológico

Las muestras fueron colectadas por personal adscrito al laboratorio clínico correspondiente. Los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit *R. rickettsii* ELISA® Helica Biosystems, Inc., el cual detecta y semicuantifica la IgG con una sensibilidad y una especificidad en perros del 99.5 y el 96%, respectivamente. Este kit se adaptó para el uso en humanos utilizando un conjugado anti-IgG humana a una dilución de 1:40,000. Para determinar la sensibilidad y la especificidad en humanos se sometieron 32 muestras a IFA, por ser la prueba de oro en cuanto al diagnóstico serológico se refiere, y se utilizó el estadístico κ para medir la concordancia entre IFA y ELISA. La interpretación del resultado de κ se basó en los criterios establecidos¹⁴.

La dilución de los sueros sanguíneos utilizada fue de 1:100 con solución amortiguadora de fosfato (PBS). El valor de corte se obtuvo con el promedio de 20 sueros de sujetos de la región clínicamente sanos y sin historia de signos clínicos compatibles con rickettsiosis y mordeduras de garrapata más dos desviaciones estándar¹⁵; de acuerdo a los anterior el valor

de corte fue de 0.569 densidad óptica. Como controles positivos se utilizaron dos sueros, uno declarado positivo por el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal de la Universidad de São Paulo y otro donado por ISESALUD y declarado positivo por el INDRE.

Los sueros que resultaron positivos a ELISA fueron probados con IFA; además, se incluyeron 20 de los seronegativos. Las placas de IFA fueron producidas en el Laboratorio de Parasitología del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal de la Universidad de São Paulo.

Factores de riesgo y signos clínicos

Para evaluar los factores de riesgo en este estudio, se aplicó un cuestionario a los sujetos en el momento de la toma de la muestra sanguínea.

Análisis estadístico

Se diseñó una base de datos con el programa Excel (Microsoft) para la captura y manejo de la información generada en el proyecto. La base de datos estuvo integrada por dos tablas con la siguiente información: resultados de los análisis serológicos en humanos y resultados de los cuestionarios epidemiológicos.

El valor de seroprevalencia se generó como sigue:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{números de reactivos positivos}}{\text{número total en el grupo}} \times 100$$

La prevalencia ajustada se generó al aplicar la ecuación descrita previamente¹⁷.

Las hipótesis a probar fueron las siguientes:

1. El valor generado de seroprevalencia era igual o distinto de 0.
2. El valor generado de seroprevalencia era igual en hombres que en mujeres, así como entre grupos de edad y ocupación.
3. Existía asociación entre los factores de riesgo y los resultados seropositivos y seronegativos a rickettsiosis.
4. Los porcentajes de sensibilidad y especificidad del kit de ELISA modificado para humanos eran adecuados para utilizarlo como prueba tamiz.
5. El nivel de concordancia entre las pruebas serológicas del estudio (IFA y ELISA) era bueno.

Las hipótesis 1 y 2 se evaluaron con el estadístico Z de análisis de proporciones (una proporción y comparación

| | | Positivo | Negativo | Total |
|-------|----------|----------|----------|-----------------|
| ELISA | Positiva | (a) | (b) | (a + b) |
| | Negativa | (c) | (d) | (c + d) |
| | Total | (a + c) | (b + d) | (a + b + c + d) |

Figura 1. Estándar de oro (IFA).

entre dos proporciones). La hipótesis 3 se probó con el estadístico χ^2 . Los valores de sensibilidad y especificidad para probar la hipótesis 4 fueron evaluados de acuerdo con una tabla de contingencia (Fig. 1). La hipótesis 5 se evaluó con la prueba de concordancia de κ .

$$Se = \frac{a \text{ (positivos)}}{a \text{ (positivos)} + c \text{ (falsos positivos)}}$$

$$Sp = \frac{d \text{ (negativos)}}{d \text{ (negativos)} + b \text{ (falsos negativos)}}$$

Análisis serológico

Para la elaboración del diagnóstico serológico, los anticuerpos contra *R. rickettsii* fueron medidos con el kit comercial *R. rickettsii* ELISA® Biosystems, Inc., que detecta y semicuantifica la IgG en perros con una sensibilidad y una especificidad del 99.5 y el 96%, respectivamente. La densidad óptica fue determinada a 450 nm. Las muestras fueron analizadas en un lector de ELISA utilizando un filtro de 450 nm. Con los resultados obtenidos se estimó la seroprevalencia ajustada.

Resultados

- El valor generado de seroprevalencia en este estudio fue mayor que 0 ($p < 0.05$).

La seroprevalencia ajustada de rickettsiosis por *R. rickettsii* fue del 3.9% (IC 95%: 0.8-5.3). Este resultado se obtuvo mediante la utilización del kit comercial estandarizado para su uso en humanos. El 12.7% (49/384) de la totalidad de pacientes incluidos en el estudio se consideraron sospechosos de la enfermedad por presentar al menos cuatro de las siguientes manifestaciones

clínicas: fiebre, eritema, epistaxis, cefalea, vómito, edema y/o haber sido mordidos por una garrapata.

- El valor generado de seroprevalencia no fue diferente en hombres y mujeres ($p < 0.05$), así como también entre grupos de edad y ocupación. En este estudio, la seroprevalencia ajustada a rickettsiosis no mostró una distribución similar ($p > 0.05$) entre las clases de sexo, los grupos de edad y los de ocupación.
- No se observó ninguna asociación ($p < 0.05$) entre los factores de riesgo a evaluar y los resultados seropositivos a rickettsiosis.
- Respecto a la evaluación de la asociación de signos clínicos con la seropositividad a rickettsiosis, no hubo ninguna asociación ($p > 0.05$) con claudicación, problemas nerviosos, transfusiones sanguíneas o ser mordido por una garrapata, pero el siguiente grupo de manifestaciones clínicas (epistaxis, vómito, artralgia, mialgias) mostró una asociación significativa ($p < 0.05$) con los pacientes seropositivos.
- En lo referente a la prueba de concordancia entre los resultados de ELISA (modificado para su uso en humanos) y los de IFA, cabe señalar que los valores de sensibilidad y especificidad generados por el kit comercial *R. rickettsii* ELISA® Biosystems, Inc., modificado para su uso en humanos fueron del 84 y el 94%, respectivamente. Al confrontar los resultados de ELISA con los de la utilización de IFA a través del estadístico κ , se generó un valor de 0.80, diferente de 0 ($p < 0.05$), y cuya magnitud la ubican como superior, alto de acuerdo sustancial^{9,14}.

Discusión

La alta especificidad (94%) del kit comercial de *R. rickettsii* ELISA® Biosystems, Inc., modificado para su uso en humanos, puede deberse a la calidad del antígeno fijado en las placas del kit, ya que la sensibilidad y la especificidad de ELISA dependen de la calidad del antígeno que se fije en la placa. Existen unos lipopolisacáridos específicos 30 de la capa externa de la bacteria (*R. rickettsii*) que se han utilizado como antígeno para las placas de ELISA, lo cual ha aumentado su especificidad y, con ello, su valor económico; la sensibilidad es moderada (84%) y puede deberse al alto valor del punto de cohorte.

El resultado de 0.80 para el estadístico κ entre ELISA y la prueba confirmatoria (IFA) se traduce en una alta

confiabilidad del kit comercial ELISA modificado para su uso en humanos para el diagnóstico de la enfermedad. La alta concordancia entre ambas pruebas puede deberse a que ambas detectan la IgG, aunque una emita fluorescencia y la otra, cambios colorimétricos¹².

Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran que existe evidencia serológica de rickettsiosis en humanos y perros en la ciudad de Ensenada; por lo tanto, debe incluirse en los diagnósticos diferenciales del sector salud, por ser una enfermedad de curso corto y con una mortalidad del 30% en pacientes no tratados^{12,19}.

El diagnóstico serológico de esta enfermedad puede realizarse por medio de ELISA, que es una técnica confiable, rápida y fácil de realizar, por los valores de concordancia que genera respecto a IFA^{9,10,13}.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son inespecíficas y difíciles de evaluar en estudios de seroprevalencia, porque generalmente se presentan en las primeras dos semanas postinfección y los anticuerpos son detectables en sangre durante 66 semanas¹⁶.

Bibliografía

1. Raoult D, Parola P. Rickettsial diseases. 1.a ed. Informa healthcare; 2007.
2. La Scola B, Raoult, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2715-27.
3. Tinoco-Gracia L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martínez MT, et al. Prevalence of Rhipicephalus sanguineus ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Vet Rec.* 2009;164(2):59-61.
4. Silverman DJ. Rickettsia rickettsii-induced cellular injury in human vascular endothelium in vitro. *Infect Immun.* 1984;44(3):545-53.
5. Ereemeeva ME, Dasch GA, Silverman DJ. Quantitative analyses of variations in the injury of endothelial cells elicited by 11 isolates of Rickettsia rickettsii. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(4):788-96.
6. Walker DH. Rocky Mountain Spotted Fever: a seasonal alert. *Clin Infect Dis.* 1995;20(5):1111-7.
7. Kim CM, Yi YH, Yu DH, et al. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(9):5766-76.
8. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, et al. Rickettsia species infecting Amblyomma cooperi ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):90-8.
9. Stenos J, Graves SR, Unsworth NB. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):1083-5.
10. Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of Rickettsia rickettsii DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2866-8.
11. Kováčová E, Kazár J. Rickettsial diseases and their serological diagnosis. *Clin Lab.* 2000;46(5-6):239-45.
12. Anaya E, Morón C, Arias P, Chauca J, Román R. Serodiagnóstico de rickettsiosis por ELISA e inmunofluorescencia IFI IgM. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de la Salud, Centro de Información y Documentación Científica; 2007.
13. Devore J, Peck R. Statistics. The exploration and analysis of data. 4.a ed. Duxbury-Thomson; 2001.
14. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-style statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 1977;33(2):363-74.
15. Halle S, Dasch G. A use of sensitive microplate enzyme-linked immunosorbent assay in retrospective serological analysis of a laboratory population at risk to infection with typhus group...
16. Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MP. J. Isolation of Rickettsia rhipicephali and Rickettsia bellii from Haemaphysalis juxtakochi Ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(3):869-73.
17. Greiner M, Gardner IA. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med.* 2000;45(1-2):43-59.
18. SAS, I. I. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. (SAS Institute Inc, 2004).
19. Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, León JJ, Walker DH, Zavala-Velázquez JE. An increase in human cases of spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico, involving children. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(6):907-10.
20. Elchos BN, Goddard J. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. *J Am Vet Med Assoc.* 2003; 223(10):1450-2.
21. Satoh H, Tsuneki A, Inokuma H, et al. Seroprevalence of antibodies against spotted fever group rickettsia among dogs and humans in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* 2001;45(1):85-7.
22. Zavala-Velázquez JE, Ruiz-Sosa J, Vado-Solis I, Billings AN, Walker DH. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatan: evidence for a prevalent spotted fever growth rickettsiosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):405-8.
23. Pinter A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB. Serosurvey of Rickettsia spp. in dogs and humans from an endemic area from Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2008;24(2):247-52.
24. Graf PC, Chretien JP, Ung L, Gaydos JC, Richards AL. Prevalence of seropositivity to spotted fever group rickettsiae and Anaplasma phagocytophilum in a large, demographically diverse US sample. *Clin Infect Dis.* 2008;46(1):70-7.
25. Hidalgo M, Sánchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker DH, Valbuena G. Prevalence of antibodies against spotted fever group rickettsiae in a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(2):378-80.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in family clusters/three states, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(19):407-10.
27. De Lara Huerta J, Cárdenas Barragán R. Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en pediatría. Revisión clínica de una serie de 115 casos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.* 2008;XXII.
28. Bustamante MJ, Pon MA. Actualización en la vigilancia epidemiológica de «rickettsiosis» (Segunda de Dos Partes). *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.* 2010;27.
29. Clements ML, Dumler JS, Fiset P, Wissemann CL Jr, Snyder MJ, Levine MM. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. *J Infect Dis.* 1983;148(5):876-80.
30. Jones D, Anderson B, Olson J, Greene C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin G to lipopolysaccharide of spotted fever group rickettsiae. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(1):138-41.