

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología

“Inmunofluorescencia indirecta para diagnóstico de Rickettsiosis en muestras séricas de *Rattus norvegicus* en zonas de hacinamiento del sector pampas de Viñani del distrito Coronel Gregorio Albarracín Lanchipa de la ciudad de Tacna-2013”.

TESIS

Presentada por:

Bach. JOEL HENRY CALLE TINTAYA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE CROHMANN"

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología

Tesis N° 246

Título profesional de Biólogo – Microbiólogo

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por resolución de Facultad N° 8051- 2015 FACL UN/JBG, el consejo de facultad designó como jurado para la sustentación de la Tesis: "Inmunofluorescencia indirecta para diagnóstico de Rickettsiosis en muestras séricas de *Rattus norvegicus* en zonas de hacinamiento del sector Pampas de Viñani en el distrito Coronel Gregorio Albarracín Lanchipa de Tacna - 2013"., el mismo que está conformado por :

Presidente : Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

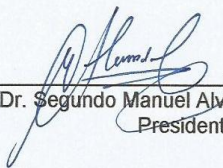
Secretario : Blgo. Víctor Hugo Carbajal Zegarra

Vocal : Msc. Vicente Chambilla Quispe

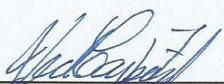
Para examinar y calificar la sustentación del informe de tesis en acto público el día 15 de abril del 2015 a las 10:00 horas. Presentado por el Bachiller JOEL HENRY CALLE TINTAYA, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual se pronunció acerca de su calificativo sobre el informe expuesto y procedió a emitir el siguiente veredicto: APROBADO por UNANIMIDAD y con el calificativo de BUENO con nota (16)


Para ratificar lo detallado firman:



Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente



Blgo. Víctor Hugo Carbajal Zegarra
Secretario



MSc. Vicente Chambilla Quispe
Vocal

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicarlo de manera muy especial a mi familia, a mi madre Lourdes, mi padre Augusto y mis hermanos Diana, Yossi y Scarlett, que a pesar de las distancias me apoyaron en todo momento, cada uno de diferentes maneras me brindaron la solidez para concluir esta investigación.

A mis amigos que siempre estuvieron a mi lado antes, durante y después de la culminación de esta investigación mostrándome su completo aprecio y ánimo.

AGRADECIMIENTOS

Al docente Dr. César Julio Cáceda Quiroz de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el asesoramiento y gestión en la ejecución del presente trabajo de investigación además por su aporte científico y acertados consejos que sirvieron de mucho en la elaboración y culminación de la investigación.

Sin duda alguna ha sido muy enriquecedor trabajar al lado de un gran equipo humano de investigación del Bioterio de la Facultad de Ciencias y aprendí de cada uno de ustedes: Aldo, Oscar, Daniel, Jhony, Fiorela, Yasmin, Adelis, Gisell y Arianna.

Pero sobre todo quiero agradecer a las personas que estuvieron en mi camino, a las diferencias de pensamiento, que me hicieron crecer intelectualmente porque solo así no me aleje del camino. Finalmente gracias a Dios.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema	3
1.2. Justificación del problema	3
1.3. Objetivos	4
1.4. Hipótesis	5
1.5. Variables de estudio	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. Rickettsiosis	10
2.3. Clasificación de la enfermedad	13
2.3.1. Grupo de las fiebres manchadas	14
A. Fiebre manchada por <i>Rickettsia rickettsii</i>	15
B. Fiebre manchada por <i>Rickettsia parkeri</i>	20
C. Fiebre manchada por <i>Rickettsia massilliae</i>	22
D. Rickettsiosis por <i>Rickettsia felis</i>	24
2.3.2. Grupo de las fiebres tíficas	25

A.	Tifus exantémico epidémico	26
B.	Tifus murino o endémico	28
2.4.	Manifestación clínica de la rickettsiosis	33
2.5.	Reservorio	36
2.5.1.	Ratas urbanas	36
A.	<i>Rattus norvegicus</i>	36
B.	Ciclo biológico	38
2.6.	Vectores	39
2.6.1.	Tifus Epidémico	39
2.6.2.	Tifus Endémico	40
2.7.	Norma Sanitaria para los trabajos de Desinsectación, Desratización, Desinfección, Limpieza y Desinfección de reservorios de agua, Limpieza de ambientes y Limpieza de tanques Sépticos	40
2.8.	Técnicas de diagnóstico laboratorial para rickettsiosis en <i>Rattus norvegicus</i>	43
2.8.1.	Procesamiento de muestras para diagnóstico	44
2.8.2.	Inmunofluorescencia indirecta para diagnóstico de rickettsiosis	45
A.	Fundamento del método	47
B.	Tipo de muestra	48
C.	Conservación de muestras antes del análisis	48

III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Materiales de laboratorio y equipos	49
3.1.1. Material de campo	49
3.1.2. Material de laboratorio	50
3.1.3. Reactivos para montaje IFI (INS)	51
3.1.4. Equipos	51
3.2. Área de estudio	52
3.3. Lugar de experimentación	52
3.4. Tipo de estudio	53
3.5. Tipo de muestra	53
3.6. Material de estudio	53
3.7. Muestreo	53
3.8. Metodología de la investigación	54
3.8.1. Procedencia del Material biológico	54
3.8.2. Selección de los puntos de muestreo	54
3.8.3. Formación de brigadas de muestreo	55
3.8.4. Método de trampeo y muestreo de pequeños mamíferos	55
A. Aspectos éticos	55
B. Bioseguridad del personal de captura y procesamiento de roedores	55
B.1. Desinfectantes	56

B.2. Ropa protectora y equipo	57
B.3. Seguridad respiratoria	57
C. Protocolo de trapeo y remoción de trampas	58
C.1. Preparación para la expedición de trapeo	58
C.1.1. Preparación de cebo	58
C.1.2. Preparación de rótulos para crioviales	58
C.1.3. Cinta blanca para numeración de las trampas	58
C.1.4. Colocación de trampas	59
D. Recolección y transporte de los roedores	60
E. Anestesia	61
F. Identificación de roedor y obtención de medidas estándar	62
G. Obtención de sangre de los roedores capturados	64
G.1. Punción cardíaca	64
H. La autopsia de los roedores capturados	65
I. Limpieza del área de toma de muestra	65
J. Descontaminación de las trampas	66
3.9. Metodología de laboratorio	66

3.9.1.	Obtención de suero	66
3.9.2.	Conservación y transporte de muestras	67
3.9.3.	Prueba de Inmufluorescencia indirecta para diagnóstico de Rickettsiosis	67
3.10.	Análisis estadístico	69
IV.	RESULTADOS	70
4.1.	Captura e identificación de roedores	70
5.1.1.	Captura de roedores por puntos de muestreo	71
5.1.2.	Identificación de roedores capturados	72
4.2.	Infección por <i>Rickettsia sp.</i> en <i>Rattus norvegicus</i>	73
4.3.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia sp.</i> y otras variables obtenidas de <i>Rattus norvegicus</i>	75
4.3.1.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia sp.</i> y la variable procedencia codificada como vertedero y peridomicilio	76
4.3.2.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia sp.</i> y la variable sexo codificada como macho y hembra	78
4.3.3.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia sp.</i> y la variable edad codificada como juvenil y adulto	80

4.3.4.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia</i> <i>sp.</i> y la variable lesión codificada como presencia y ausencia	83
4.3.5.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia</i> <i>sp.</i> y la variable peso	85
4.3.6.	Confrontación entre la infección por <i>Rickettsia</i> <i>sp.</i> y la variable longitud total	88
V.	DISCUSIÓN	91
VI.	CONCLUSIONES	100
VII.	RECOMENDACIONES	102
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
IX.	ANEXOS	113
X.	GLOSARIO	137

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 01: Distribución geográfica de las rickettsiosis.	10
CUADRO 02: Manifestaciones clínicas del Tifus exantémico, en porcentajes.	35
CUADRO 03: Diferencias físicas entre <i>Rattus rattus</i> y <i>Rattus norvegicus</i> .	38
CUADRO 04: Muestras necesarias para el diagnóstico de la rickettsiosis.	44

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 01: Roedores capturados en diferentes puntos de muestreo.	71
TABLA 02: Identificación de roedores.	72
TABLA 03: Casos positivos y negativos a infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI.	74
TABLA 04: Confrontación entre los casos de infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI y procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio) para las muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> .	76
TABLA 05: Confrontación entre los casos de infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI y sexo (codificada como macho y hembra) para las muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> .	78

TABLA 06:	Confrontación entre los casos de infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI y edad (codificada como juvenil y adulto) para las muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> .	80
TABLA 07:	Confrontación entre los casos de infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI y lesión (codificada como presencia y ausencia) para las muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> .	83
TABLA 08:	Confrontación entre los casos de infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI y peso para las muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> .	85
TABLA 09:	Confrontación entre los casos de infección por <i>Rickettsia sp.</i> determinada por IFI y longitud total para las muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> .	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 01: Distribución de especies de rickettsias en América del Sur y el Caribe.	12
FIGURA 02: <i>Amblyomma cajennense</i> .	15
FIGURA 03: <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	23
FIGURA 04: Ciclo de transmisión del tifus exantémico epidémico.	27
FIGURA 05: Ciclo de transmisión del Tifus murino o endémico.	31
FIGURA 06: Ciclo biológico de <i>Rattus norvegicus</i> .	39
FIGURA 07: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de la captura en diferentes puntos de muestreo.	72
FIGURA 08: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de la identificación de roedores.	73
FIGURA 09: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de infección por <i>Rickettsia</i> sp.	

determinada por IFI en muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 75

FIGURA 10: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 77

FIGURA 11: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 78

FIGURA 12: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y sexo (codificada como macho y hembra) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 79

FIGURA 13: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y sexo (codificada como macho y hembra) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 80

- FIGURA 14:** Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y edad (codificada como juvenil y adulto) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 81
- FIGURA 15:** Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y edad para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 82
- FIGURA 16:** Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y lesión (codificada como presencia y ausencia) para las muestras de *Rattus norvegicus*. 84
- FIGURA 17:** Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y lesión (codificada como presencia y ausencia) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 85
- FIGURA 18:** Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y peso para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 86

- FIGURA 19:** Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y peso para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 87
- FIGURA 20:** Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y longitud total para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 89
- FIGURA 21:** Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y longitud total para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*. 90

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 01: Lista de verificación de materiales.	114
ANEXO 02: Formulario de recuento de trampas.	115
ANEXO 03: Preparación del Buffer y soluciones para IFI.	116
ANEXO 04: Ubicación del Distrito Coronel Gregorio Albarracín.	118
ANEXO 05: Ubicación del sector Pampas de Viñani.	119
ANEXO 06: Mapa de vista del sistema de posición global (GPS) de los puntos de muestreo.	120
ANEXO 07: Ubicación de los puntos de muestreo por el Sistema de posición Global (GPS).	121
ANEXO 08: Cronograma de salidas de campo.	122
ANEXO 09: Fotografías de muestreo y captura de <i>Rattus norvegicus</i> : (1), (2), (3), y (4) selección del área de muestreo.	123

- ANEXO 10:** Fotografías de muestreo y captura de *Rattus norvegicus*: (1), (2), (3), (4) y (5) colocación de trampas tomahawk®. 124
- ANEXO 11:** Fotografías de muestreo y captura de *Rattus norvegicus*: (1), (2), (3), (4) y (5) recolección y traslado de trampas activadas. 125
- ANEXO 12:** Fotografías del procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1a) colocación de roedores ;(1b) campana con cloroformo (2) anestesia en campana de vidrio; (3a) Ketamina 10%;(3b) dosificación y (3c) administración intramuscular. 126
- ANEXO 13:** Fotografías del procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1) Pesaje (balanza electrónica) ;(2) longitud; (3) sexuado (identificación de sexo) ;(4a) fenología (adulto); (4b) fenología (juvenil) y (5) determinación de lesión. 127
- ANEXO 14:** Fotografías del procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1) Fijación y punción cardíaca;(2) extracción de sangre y (3a) trasvase a tubos de suero;(3b) rotulación de tubo y (3c) tubos rotulados en gradilla. 128
- ANEXO 15:** Fotografías del procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1a) centrifuga ;(1b) centrifugación; (1c) post centrifugación y (2) fase forme y suero. 129

ANEXO 16: Fotografías del procesamiento laboratorial de <i>Rattus norvegicus</i> concerniente al protocolo de: (1a) tubos con fase forme y suero; (1b) separación de suero; (1c) suero en criovial y (2) crioviales en gradilla.	130
ANEXO 17: Fotografías del procesamiento laboratorial para envío de muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> concerniente al protocolo de: (1) Selección de crioviales; (2) sellado hermético de crioviales ;(3) cooler con gel pack para traslado l y (4) ICE LINE (cadena de frio -20°C).	131
ANEXO 18: Fotografías de resultados de la Inmunofluorescencia indirecta de rickettsiosis en muestras séricas de <i>Rattus norvegicus</i> concerniente al protocolo de: (1) Microfotografía de epifluorescencia de resultados negativos por IFI no se observa corpúsculos fluorescentes intracitoplasmáticos(objetivo 40X);(2) microfotografía de epifluorescencia de resultados positivos por IFI, se observa corpúsculos fluorescentes intracitoplasmáticos (objetivo 40X).	132
ANEXO 19: Criterios en la interpretación de resultados.	133
ANEXO 20: Producción de láminas IFI.	134
ANEXO 21: Criterios de control: aceptación y rechazo.	136

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Tacna durante los meses de Octubre 2013 a Diciembre del 2014; el objetivo fue determinar el comportamiento de la Rickettsiosis en *Rattus norvegicus* procedente de zonas hacinamiento del sector Pampas de Viñani del distrito Coronel Gregorio Albarracín Lanchipa en la ciudad de Tacna.

Se realizó una técnica inmunoserológica en muestras séricas de *Rattus norvegicus*, Se realizó un análisis descriptivo por medio de tablas de contingencia considerando lo siguiente: infección por *Rickettsia sp.* determinada por Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras séricas de *R. norvegicus* frente a procedencia (peridomicilio o vertedero), sexo (macho o hembra), edad (juvenil o adulto), lesión (presencia o ausencia), peso y longitud total. Se obtuvo que la infección por *Rickettsia sp.* en *R. norvegicus* determinada por IFI fue 12,31 %. Para la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* en *R. norvegicus* y procedencia peridomicilio, se determinó que esta fue más relevante que la procedencia vertedero. Se estableció que la infección por *Rickettsia sp.* en *R. norvegicus* en roedores hembra fue mayor que en machos, en adultos fue mayor que en juveniles y frente a lesión ausente fue el 100 %. Se estableció que la infección por *Rickettsia sp.* en *R. norvegicus* relacionada a peso fue mayor en el

intervalo 188 - 212 gr. Se estableció que la infección por *Rickettsia sp.* en *R. norvegicus* relacionada a longitud total fue mayor en el intervalo 25,4 - 27,4 cm.

Palabras clave: *Rickettsia sp.*, *Rattus norvegicus*, Inmunofluorescencia indirecta (IFI), anticuerpos antirickettsias.

ABSTRACT

The research was conducted in the city of Tacna during the months of October 2013 to December 2014; the objective was to determine the behavior of *Rattus norvegicus* from Rickettsiosis in crowded areas of the Pampas Viñani sector in Coronel Gregorio Albarracín Lanchipa district from Tacna.

One immunoserological technique was performed on serum samples of *Rattus norvegicus*, a descriptive analysis was performed using contingency tables whereas: *Rickettsia sp.* immunofluorescence determined by indirect (IIF) in serum samples from *R. norvegicus* against provenance (peridomicile or landfill), sex (male or female), age (young or adult), injury (presence or absence), weight and overall length. It was found that the *Rickettsia sp. R. norvegicus* was determined by IIF 12.31%. For the confrontation between *Rickettsia sp. R. norvegicus* and peridomicile origin, it was determined that this was more relevant than the landfill origin. It was established that the *Rickettsia sp. R. norvegicus* in female rodents was higher than in males was higher than in adults and juveniles against injury was absent 100%. It was established that the *Rickettsia sp. R. norvegicus* was related to increased weight in the range 188-212 gr. It was established

that the *Rickettsia* sp. related to *R. norvegicus* in total length was greater in the range from 25.4 to 27.4 cm.

Keywords: *Rickettsia*, *Rattus norvegicus*, Indirect immunofluorescence (IIF), antirickettsias antibodies.

I. INTRODUCCIÓN

Las zoonosis representan una seria amenaza para la salud y el bienestar de la población de todo el mundo entre ellos, la rickettsiosis, que es una enfermedad reemergente de importancia en salud pública. Posee varios géneros y especies de la familia Rickettsiaceae, por ser agente de la fiebre maculosa y los tifus de las malezas en vastas áreas de los países del continente Americano.

La rickettsiosis es una enfermedad bacteriana febril aguda con síntomas inespecíficos, como fiebre, anorexia, cefalea, náuseas, mialgias y vómitos. Los vectores son pulgas, piojos y garrapatas que transmiten esta bacteria a los reservorios que suelen ser roedores, perros, marsupiales y eventualmente al hombre. Es posible que muchas personas afectadas hagan la enfermedad con síntomas atenuados y no acudan a su médico para un chequeo.

Esta enfermedad infecciosa sigue constituyendo, un problema sanitario de gran impacto y no hay que olvidar que han causado millones de muertos (el tifus afectó a 30 millones de personas en Rusia y Polonia entre 1915 y 1922, causando una cifra estimada de 3 millones de muertes).

El Perú cuenta con reportes acerca de circulación de rickettsiosis distribuida preferentemente en localidades con características que favorecen la presencia de vectores y reservorios animales, existe el desconocimiento por parte de profesionales de la salud como de la población que se encuentra afectada para prevenir la ocurrencia de la enfermedad.

En nuestro medio, es fundamental para el diagnóstico considerar el contexto epidemiológico: zona geográfica, viajes a zonas endémicas, contacto con animales reservorio, antecedentes de acampadas y medio profesional. El síndrome febril indiferenciado es un cuadro clínico frecuente en el Perú, la mayoría de ellos quedan sin diagnóstico etiológico. En Tacna región fronteriza se cuenta con reportes de presencia de esta enfermedad.

Se planteó la necesidad de realizar el presente estudio a fin de conocer el comportamiento de esta enfermedad en el reservorio (*Rattus norvegicus*) involucrado en su transmisión, permitiendo conocer su importancia. Así mismo recomendar vigilancia y diagnóstico de esta enfermedad reemergente a partir del término de la siguiente investigación.

1.1. Problema

¿Es posible determinar el comportamiento de la rickettsiosis en *Rattus norvegicus* procedente de zonas de hacinamiento del sector Pampas de Viñani en el distrito Coronel Gregorio Albarracín de la ciudad de Tacna - 2013?

1.2. Justificación del problema

Las enfermedades reemergentes son un problema prioritario en la población mundial y en la actualidad vienen formando parte de la agenda de la organización mundial de la salud.

En Tacna se han reportado casos confirmados de rickettsiosis en muestra séricas humanas, siendo necesario seguir haciendo estudios para conocer la ocurrencia de esta enfermedad.

La importancia del presente estudio fue determinar el comportamiento de la rickettsiosis en *Rattus norvegicus* en el distrito Coronel Gregorio Albarracín de la ciudad de Tacna; esto permitió conocer la presencia de rickettsiosis en el reservorio, en uno de los distritos con mayor hacinamiento de la ciudad. Por tanto permitirá a las autoridades competentes establecer medidas de prevención y control.

La realización de la siguiente investigación es factible porque es de interés en salud pública, los procedimientos son estandarizados y así mismo se puede acceder a la población en estudio.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Determinar el comportamiento de la rickettsiosis en *Rattus norvegicus* procedente de zonas hacinamiento del sector Pampas de Viñani del distrito Coronel Gregorio Albarracín en la ciudad de Tacna.

1.3.2. Objetivos específicos

- Realizar la captura de *Rattus norvegicus*.
- Determinar infección por *Rickettsia sp.* mediante Inmunofluorescencia indirecta en muestras séricas de *Rattus norvegicus*.
- Conocer la relación entre la infección por *Rickettsia sp.* mediante Inmunofluorescencia indirecta en muestras séricas de *Rattus norvegicus* con procedencia, sexo, edad, lesión, peso y longitud total.

1.4. Hipótesis

Es posible determinar el comportamiento de la rickettsiosis en *Rattus norvegicus* procedente de zonas de hacinamiento del sector Pampas de Viñani en el distrito Coronel Gregorio Albarracín de la ciudad de Tacna - 2013.

1.5. Variables de estudio

1.5.1. Variable dependiente

- Infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus*.

1.5.2. Variable independiente

- Procedencia (vertedero y peridomicilio).
- Sexo (macho y hembra).
- Edad (juvenil y adulto).
- Lesión (presencia y ausencia).
- Peso.
- Longitud total.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes

Las rickettsiosis son una importante causa de enfermedades en los humanos alrededor del mundo. La incidencia y distribución geográfica de casos de fiebre manchada de las Montañas Rocosas, han variado impresionantemente desde el reconocimiento de la enfermedad a finales del siglo XIX. El panorama global de la rickettsiosis está asociado al subdesarrollo económico y cultural y presentan elevadas incidencias en zonas con suburbanización vulnerable.

En los Angeles, Estados Unidos, 33 casos de tifus murino fueron asociados con gatos domésticos seropositivos, lo cual enfoca el rol importante que juegan estas mascotas en la transmisión del tifus; en este estudio también se asociaron los casos, a la presencia de zarigüeyas, cerca de las viviendas de los pacientes (Adams, Emmons y Brooks, 1970).

En México, la existencia de áreas que reúnen condiciones geográficas, epidemiológicas, demográficas y socioeconómicas, así como de marginación y pobreza de la población afectada, que

favorecen su transmisión; se estima que aproximadamente el 60% del territorio nacional presenta estas condiciones. Desde 1940 se ha detectado en México la Fiebre Manchada de las Montañas Rocallosas en sueros de humanos (Zavala, Xue y Walker, 1996).

La diferente capacidad de respuesta inmunitaria y la malnutrición, afectan mayoritariamente a los niños; siendo esta enfermedad más común de los 5 a los 9 años de edad. Además esta enfermedad producida por vector es considerada estacional, con más frecuencia en los meses de abril a septiembre. El periodo incubación 3 a 12 días, promedio 7 días (Zavala *et al*, 1996).

La bacteria *Rickettsia rickettsii* fue descrita por primera vez en Brasil São Paulo por Piza en 1932, como el agente de la fiebre maculosa brasileña transmitida por la garrapata *Amblyomma cajennense*. En esa época fue demostrada también la semejanza de esta enfermedad con la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas.

En 1939, la fiebre maculosa brasileña y el tifus del ratón fueron descritos en el estado de Minas Gerais por Dias y Martins. La bacteria *Rickettsia typhi* fue aislado por primera vez en un paciente humano en São Paulo por Travassos, Rodrigues y Carrijo en 1949.

Se diagnosticaron por serología de inmunofluorescencia indirecta casos en animales domésticos de rickettsiosis causados por *Rickettsia* del grupo de la fiebre maculosa en Uruguay (Conti-Diaz, Rubio y Somma, 1990).

En Argentina se diagnosticó una infección por *R.rickettsi* del grupo de la fiebre maculosa en un paciente de la provincia de Jujuy, y un sondeo serológico en la misma área y período de tiempo, se detectó anticuerpos reactivos con *R. rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis* y *R. typhi*. El vector sospechado era *A.cajennense* recolectado de caballos y animales domésticos en la misma área (Ripoll, Remondegui y Ordonez, 1990).

En Colombia por Inmunofluorescencia indirecta, se detectaron anticuerpos antirickettsias en 335 (43 %) de los roedores y en 53 (24 %) de los sueros humanos estudiados. Además, se amplificaron secuencias del gen *gltA* específicas del género *Rickettsia* en 23 (6,8 %) muestras de hígado de roedores, las cuales mostraron una similitud del 98,7 % con *R. prowazekii*. Una secuencia de *gltA* obtenida de larvas de garrapatas del género *Amblyomma sp.*, tuvo una identidad mayor de 99 % con las secuencias de *Rickettsia tamurae* (Quintero, Díaz, Agudelo, Arboleda y Rodas, 2012).

En Perú desde 1989, existen notificaciones sustanciales de casos de tifus epidémico distribuido en las regiones de Ancash, Arequipa, Cusco, Huánuco, Piura, y Puno. Casi el 70% de los casos de tifus epidémico están concentrados en dos provincias de la región Cusco, Quispicanchis y Paucartambo, con una población combinada de 120 000 habitantes (Walter, Zavala-Velazquez y Ramirez, 1999).

Otras rickettsiosis fueron investigadas en Perú, tales como el tifus del ratón, descrito en pacientes de la provincia de Huari, región Ancash (Pachas, Jaramillo y Hoyos, 1999) y *Rickettsia felis* fue identificado en pulgas *Ctenocephalides canis* de animales domésticos y congéneres de casos sospechosos de tifus del ratón en domicilios de los pacientes infectados (Pachas, Morón y Hoyos, 2001).

El Instituto Nacional de Salud, ha procesado sueros de diferentes localidades del Perú para identificar la presencia de anticuerpos contra *Rickettsia sp.* y encontró, 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 (Anaya, Palacios, Pachas, Mendoza y Mosquera, 2012).

2.2. Rickettsiosis

Es una zoonosis de distribución mundial (Cuadro 01), la cual presenta cuadros clínicos variados e inespecíficos como lo son el síndrome febril indiferenciado, cefalea, escalofríos, exantema, tos, conjuntivitis, mialgia, artralgia, anorexia, náuseas con una frecuencia porcentual variable. La rickettsiosis es transmitida por diferentes artrópodos como garrapatas (*Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus*), ácaro del ratón (*Allodermanyssus sanguineus*), piojos (*Pediculus humanus* variedad *corporis*) y pulgas del gato (*Ctenocephalides felis*) y de la rata (*Xenopsylla cheopis*) (Parola, Paddock y Raoult, 2005).

Cuadro 01: Distribución geográfica de las rickettsiosis.

Enfermedad	Microorganismo	Enfermedad	Distribución
Fiebre maculosa	<i>Rickettsia rickettsii</i> . <i>R. akari</i> . <i>R. conorii</i> . <i>R. sibirica</i> . <i>R. australis</i> .	Fiebre maculosa de las montañas Rocosas. Viruela rickettsiana. Fiebre botonosa Fiebre por garrapatas siberiano. Tifus por garrapatas australiano.	Hemisferio occidental Estados Unidos antigua URSS Países mediterráneos, África, India Siberia, Mongolia Australia
Tifus	<i>R. prowasekii</i> <i>R. typhi</i> .	Tifus epidémico Tifus recrudesciente Tifus murino	América del Sur, África, Asia Todo el mundo Todo el mundo.
Tifus de los matorrales.	<i>R. tsutsugamushi</i>	Tifus de los matorrales	Asia, norte de Australia, islas del Pacífico.

Fuente: Walker y Dumler, 1997.

El agente etiológico de la rickettsiosis es *Rickettsia sp.*, pequeños cocobacilos Gram negativos pleomórficos, inmóviles y aerobios, que se comportan como patógenos intracelulares obligados y están relacionados serológicamente. Se tiñen razonablemente bien con los métodos de Giemsa, Giménez y débilmente con la tinción de Gram (Anda, Blanco, Jado, Marin, Oteo, Pons y Portillo, 2007). Este grupo de bacterias representan una de las mayores ironías biológicas conocidas hasta ahora. Por una parte, han sido causantes desde la antigüedad, y aún en nuestros días, del tifus epidémico, una de las plagas más devastadoras que ha sufrido la humanidad; por otro lado, estudios filogenéticos indican que un antecesor evolutivo de una “*Rickettsia*” dio lugar a uno de los sucesos más importantes en la evolución de los eucariotas: el origen de las mitocondrias.

Las rickettsiosis constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución geográfica heterogénea cuya severidad varía desde formas benignas y autolimitadas a infecciones fulminantes de elevada mortalidad (Figura 01). La mayoría de los casos se adquieren por picadura de garrapatas, piojos o pulgas que están infectadas por el microorganismo. El hombre es un huésped accidental en el ciclo biológico de las rickettsias en el que intervienen diversos mamíferos (reservorios) y artrópodos que no sufren, en

general, daño por la presencia de la bacteria y actúan como reservorios y/o vectores del microorganismo. Diversos mamíferos, esencialmente pequeños roedores, ganado y perros, contribuyen a perpetuar la infección y cerrar el ciclo biológico (Anda *et al*, 2007).

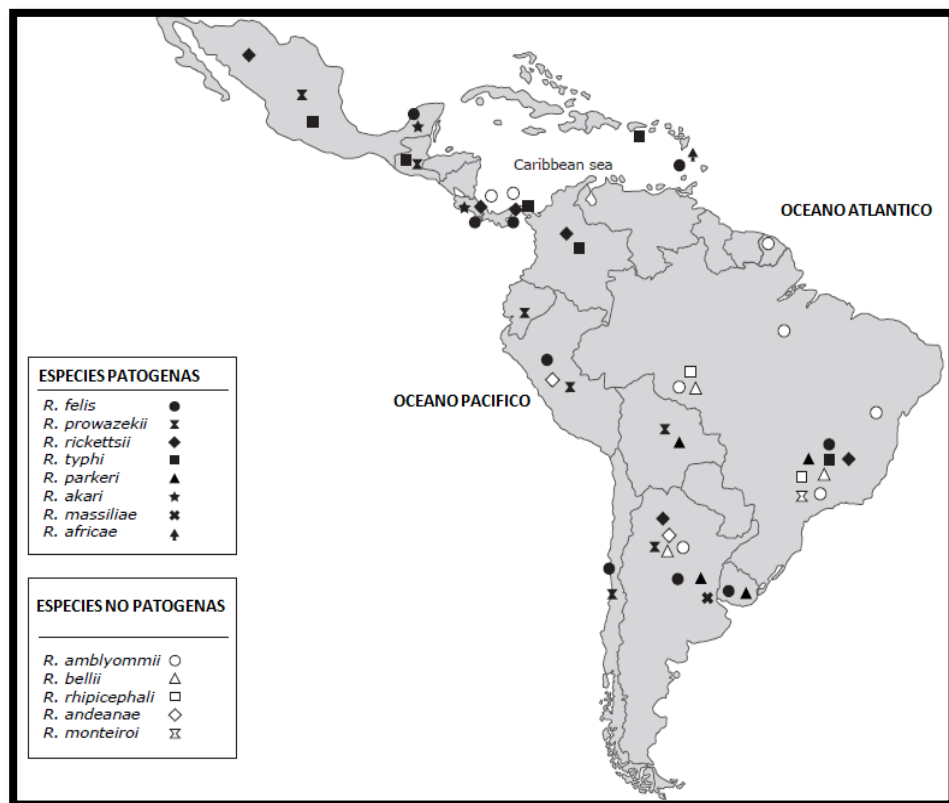


Figura 01: Distribución de especies de rickettsias en América del sur y el Caribe.

Fuente: Labruna, Mattar, Nava, Bermúdez, Venzal, y Dolz, 2011.

Las rickettsias tienen una capa mínima de peptidoglicanos y el lipopolisacárido (LPS) tiene una actividad endotóxica débil. Pueden

ser controladas o destruidas por antibióticos. La mayoría son susceptibles a los antibióticos del grupo de la tetraciclina. Contienen ARN y ADN además de enzimas para realizar el ciclo de Krebs, y ribosomas para la síntesis de proteínas.

2.3. Clasificación de la enfermedad

Las rickettsiosis están clasificadas en base a las proteínas de superficie inmunodominantes rOmpA y rOmpB (proteínas externas de membrana A y B) que permite la diferenciación de dos grupos; el grupo de las fiebres manchadas (SFG, spotted fever group) y el grupo tifus (TG, tifus group). El gen que expresa rOmpA se ha identificado en casi todas las especies del SFG y no se ha encontrado en el TG (Zavala C., Ruiz y Zavala V., 2004).

También las especies de ambos grupos presentan una distribución diferente en función del área geográfica y del tipo de hospedador y vector. Así, en América, la especie más frecuente del grupo de las fiebres manchadas es *R. rickettsii*, mientras que en la cuenca mediterránea es *R. conorii*. A continuación se detallan las especies más relevantes desde el punto de vista clínico-epidemiológico (Anda *et al*, 2007).

2.3.1. Grupo de las fiebres manchadas

Las rickettsias pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas muestran una distribución mundial. La mayoría se transmiten por garrapatas y están muy relacionadas serológicamente. Principalmente son clasificadas por el cuadro clínico que producen, aumento reciente de su área de distribución y características epidemiológicas.

A. Fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii*

Es el agente causal de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. En esta enfermedad Ricketts describió en 1909 los microorganismos que luego llevarían el nombre de *Rickettsia* en su honor.

Existen citas de esta rickettsia en Argentina, Brasil, Canadá, Colombia, Costa Rica, Estados Unidos, México y Panamá, con casos fatales en varios de estos países (Labruna, 2009).

Aunque ha sido detectada infectando distintas especies de garrapatas, entre ellas *Amblyomma aureolatum* y *Rhipicephalus sanguineus*, el principal vector en Sudamérica

es *Amblyomma cajennense* (Figura 02), *Dermacentor variabilis* y *Dermacentor andersoni* son las garrapatas que actúan como vectores de *R.rickettsii* en Estados Unidos, *R. sanguineus* es también sindicada como un potencial transmisor de esta rickettsia en Estados Unidos, México y Brasil, mientras que en Costa Rica se encontró a *Haemaphysalis leporispalustris* naturalmente infectada con *R. rickettsii* (Parola, Labruna y Raoult,2009).



Gráfica 02: *Amblyomma cajennense*.

Fuente: Díaz y Cataño, 2010.

Hasta el momento, todos los casos letales de rickettsiosis humana en América fueron causados por *R. rickettsii*, con reportes para Argentina (provincia de Jujuy), Brasil, Colombia, Estados Unidos y México (Paddock, Fernández, Echenique, Sumner, Reeves & Zaki, 2008),

siendo Brasil el país que presenta el mayor número de casos letales por año, donde la letalidad en estados como el de São Paulo alcanza valores cercanos a 30% (casos confirmados por laboratorio). Como se mencionó anteriormente, tanto en Brasil como en Argentina el vector involucrado en la mayoría de los casos es *A. cajenense*, aunque *A. aureolatum* también podría estar relacionada con algunos casos de fiebre manchada ocurridos en el estado de São Paulo (Labruna, 2009).

Para adherirse a la célula la bacteria utiliza las proteínas de membrana rOmpA y rOmpB y otros lipopolisacáridos (Crocquet, Díaz-Montero, Feng, Li, Barrett y Walker, 2001). Después de entrar en la célula, se propaga rápidamente de una célula a otra atravesando las membranas (Heinzen, 2003).

La multiplicación de las rickettsias causa una vasculitis, cuya expansión lleva a microhemorragias, aumento de la permeabilidad vascular, edema, activación de los mecanismos humorales de inflamación y la cascada de la coagulación. Esta vasculitis es la responsable del cuadro

clínico y de las anormalidades que se detectan en el laboratorio. En esta rickettsiosis se habla clínicamente de una tríada compuesta por fiebre, cefalea y exantema, aunque esta tríada en general no se presenta al inicio de la enfermedad o incluso puede no presentarse en algunos casos. La fiebre y la cefalea casi siempre están presentes, pero no así el exantema (Díaz y Cataño, 2010). En su fase aguda, la enfermedad provocada por *R. rickettsii* deviene en un compromiso sistémico que puede ser letal si no se diagnostica correctamente a tiempo y se aplica un tratamiento en base a antibióticos, además gran parte de los pacientes no recuerdan haber sido picados previamente por garrapatas (Díaz y Cataño, 2010).

El diagnóstico resulta dificultoso en las etapas tempranas de la enfermedad, ya que las manifestaciones clínicas son comunes con otras enfermedades como influenza y dengue. Además de los síntomas clásicos de la tríada también hay mialgia, náuseas, vómito y dolor abdominal. El exantema máculopapular, se presenta sólo en algunos de los casos. Comienza en muñecas y tobillos para esparcirse posteriormente en forma centrípeta hasta

comprometer el tronco. En los casos graves, el exantema pasa de ser petequial a hemorrágico en forma de equimosis a consecuencia de la vasculitis generalizada. Si el paciente no es tratado, puede evolucionar con la necrosis en extremidades y otras regiones del cuerpo. En las fases más agudas se puede observar edema pulmonar, neumonía intersticial, cambios neurológicos focales, convulsiones, falla renal aguda, edema periférico e hipotensión hipovolémica debido a la pérdida de fluidos intravasculares (Valbuena, 2007).

Al tratarse la rickettsiosis, por *R. rickettsii*, de una enfermedad con una sintomatología inespecífica y común a muchas otras afecciones, el diagnóstico clínico puede ser dificultoso y debe ser apoyado por la epidemiología. Ante la sospecha clínica y epidemiológica (exposición a garrapatas) debe iniciarse el tratamiento, ya que en las pruebas diagnósticas serológicas los anticuerpos específicos solo aparecen a la semana o diez días de la infección (Kaplan y Schonberger, 1986).

Las pruebas serológicas y en especial la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), sigue siendo la prueba patrón para el diagnóstico, ya que como *R. rickettsii* infecta las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y circula en muy pequeñas cantidades en sangre, las técnicas moleculares como PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o por medio de cultivos celulares, no son tan útiles. Aunque, una desventaja de las pruebas serológicas es que los anticuerpos específicos no son perceptibles hasta los 7-10 días, es por ello que en esta etapa, para decidir si se aplica tratamiento o no, se debe recurrir a la clínica y epidemiología.

Es por esto que lo ideal es realizar una toma de muestra a las dos o tres semanas del inicio del caso, ya que la sensibilidad de la IFI es de aproximadamente 90% y realizar la toma de una segunda muestra dos a cuatro semanas después para así confirmar el diagnóstico. Si el paciente posee exantema se puede realizar una biopsia superficial y realizar Inmunohistoquímica (IHC) o PCR a partir de la muestra de tejido. Estas técnicas son bastante rápidas y con

una buena sensibilidad (70%), aunque la muestra debe ser obtenida antes de administrar el tratamiento.

B. Fiebre manchada por *Rickettsia parkeri*

Los primeros casos de fiebre manchada en humanos atribuidos a *R. parkeri* fueron diagnosticados en Estados Unidos recién en el 2004 (Paddock, Sumner, Comer, y Zaki, 2004), a pesar de que esta rickettsia había sido aislada de la garrapata *Amblyomma maculatum* 70 años antes (Parker, Kohls, Cox, y Davis, 1939), y posteriormente demostró ser patógena al ser inoculada en cobayos y producir un cuadro febril leve compatible con otras fiebres manchadas como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas y la fiebre botonosa o del Mediterráneo por *Rickettsia conorii* (Parker, 1940). Finalmente, en 1965, esta rickettsia del grupo de las fiebres manchadas es considerada una nueva especie y denominada *R. parkeri*. Actualmente *R. parkeri* se considera un importante patógeno emergente en América (Sumner, Durden, Goddard, Stromdahl, Clark, y Reeves, 2007).

El diagnóstico de nuevos casos de rickettsiosis humana causada por *R. parkeri* en Estados Unidos, tras la aplicación

de un conjunto completo de técnicas de diagnóstico como tests serológicos, inmunohistoquímica, cultivo celular y marcadores moleculares, permitió reconocer con certeza a *R. parkeri* como un agente patógeno para los humanos, y a la garrapata *A. maculatum* como su principal vector (Sumner *et al*, 2007).

En Sudamérica, *R. parkeri* ha sido detectada infectando a la garrapata *A. triste* en Argentina (Nava, Elshenawy, Eremeeva, Sumner, Mastropaolo, y Paddock, 2008), Brasil (Silveira, Pacheco, Szabó, Ramos, y Labruna, 2007) y Uruguay (Pacheco, Venzal, Richtzenhain, y Labruna, 2006), y casos de fiebre manchada atribuidos a esta rickettsia fueron diagnosticados en Argentina (Seijo, Picollo, Nicholson, y Paddock, 2007) y en Uruguay (Conti-Díaz, Moraes, Pacheco, y Labruna, 2009). En ambos países el vector involucrado en la transmisión de *R. parkeri* es *A. triste*. En Uruguay se encontraron garrapatas infectadas con *R. parkeri* en los departamentos de Montevideo, Canelones y Maldonado, todas localidades ubicadas al sur del país (Pacheco *et al*, 2006). En Uruguay, inicialmente los casos de rickettsiosis humana transmitidos por garrapatas fueron en primera

instancias asociados a *Rickettsia conorii* debido a que el diagnóstico de laboratorio se realizaba por Inmunofluorescencia indirecta utilizando un kit comercial de Ig-M anti *R. conorii* (Conti-Díaz *et al*, 1990).

En Argentina, la rickettsiosis humana atribuida a *R.parkeri* fue comunicada para la región del delta del Paraná en la provincia de Buenos Aires, en el mismo sitio donde especímenes de *A. triste* fueron hallados infectados con *R. parkeri*. El diagnóstico clínico se caracterizó por un síndrome febril agudo con escalofríos y sudoración, mialgias, cefalea, astenia, con la aparición de un exantema maculopapuloso con elementos purpúricos (Seijo *et al*, 2007).

C. Fiebre manchada por *Rickettsia massiliae*

La mayoría de los registros de *R. massiliae* corresponden a Europa y África, donde fue detectada infectando garrapatas del género *Rhipicephalus* (Parola *et al*, 2009).

La transmisión trans estadial y trans ovárica de esta rickettsia ha sido demostrada en *Rhipicephalus turanicus*, que

es una garrapata filogenéticamente relacionada a *R. sanguineus* (Figura 03), por lo que de allí se infiere que las especies que forman este complejo pueden actuar como reservorios de *R. massiliae* en la naturaleza (Matsumoto, Ogawa, Brouqui, Raoult, y Parola, 2005).



Figura 03: *Rhipicephalus sanguineus*.

Fuente: Díaz y Cataño, 2010.

En Europa, por medio de la utilización de herramientas moleculares, se reveló que casos de fiebre manchada en humanos atribuidos a *Rickettsia conorii* en realidad correspondían a *R. massiliae*, confirmando así la potencial patogenicidad de esta bacteria para los humanos. Los síntomas del paciente infectado fueron fiebre, escaras

necróticas, hepatomegalia y exantema maculopapuloso en las palmas de las manos y en las plantas de los pies (Vitale, Mansuelo, Rolain, y Raoult, 2006).

En Sudamérica los únicos reportes de *R. massiliae* fueron realizados en Argentina. Un estudio sobre prevalencia de rickettsias en *R. sanguineus* colectadas en la ciudad de Buenos Aires arrojó como resultado 21,5% de las garrapatas infectadas con *R. massiliae*. El primer caso de una infección con *R. massiliae* en humano para América también tuvo su origen en Buenos Aires. La paciente a la que se le diagnosticó la enfermedad presentó un cuadro clínico con fiebre, exantemas purpúricos en las extremidades superiores e inferiores, y una lesión de piel compatible con escara, que se produce en el sitio de fijación de la garrapata (Cicuttin, Mansuelo, Rolain, y Raoult, 2004).

D. Rickettsiosis por *Rickettsia felis*

Fue detectada por primera vez en pulgas de *Ctenocephalides felis* en 1918. Aunque su patogenicidad fue demostrada por primera vez en 1991 en un paciente con una enfermedad febril semejante al tifus murino en Texas

(EE.UU.) y no pudo ser cultivada y caracterizada hasta el año 2001, evidenciándose que sólo puede crecer a bajas temperaturas. Posteriormente en 2002, se infectaron tres pacientes en México que sufrieron fiebre, exantema, dolor de cabeza y afectación del sistema nervioso central. Recientemente se han descrito casos en España, Brasil, Alemania y sudeste asiático. Además, en España, Francia, Reino Unido, Brasil, Argentina, Etiopía, Tailandia y Nueva Zelanda se ha detectado en pulgas. Por el momento no se conocen en profundidad sus características clínicas y su incidencia, pero los datos epidemiológicos (reservorio en animales peridomésticos), vector de transmisión y cuadro clínico similar al del tifus murino hacen pensar que un número importante de casos de fiebre de duración intermedia y también algunos de los diagnosticados como tifus murino podrían deberse a *R. felis* (Anda *et al*, 2007).

2.3.2. Grupo de las fiebres tíficas

Los representantes de este grupo son dos: *R. prowazekii*, responsable del tifus exantemático epidémico y *R. typhi*, que produce el llamado tifus murino o endémico.

A. Tifus exantémico epidémico

La enfermedad producida por *R. prowazekii* se conoce desde el año 1083 y se transmite por el piojo corporal, *Pediculus humanus* variedad *corporis*. El reservorio es el ser humano, en el que la infección persiste durante los periodos entre las epidemias. El vector se infecta al alimentarse de sangre de un paciente con enfermedad aguda, excretando rickettsias por las heces durante 5-7 días. El hombre se infecta al contaminarse la picadura u otras heridas superficiales de la piel con las heces o con el piojo aplastado sobre el sitio de la picadura. También se puede adquirir la enfermedad a través de la inhalación de heces secas de piojos infectados o por contacto directo a través de las mucosas. En algunas zonas de Estados Unidos, las ardillas voladoras son un reservorio y la pulga de la ardilla un vector potencialmente transmisor de la enfermedad al hombre. No se transmite directamente entre personas. En la actualidad, el tifus epidémico está circunscrito a regiones montañosas del sur y centro de América, México, África Central y Oriental y algunos países de Asia. La proliferación de piojos se propicia en situaciones de catástrofe, hambruna, falta de higiene y hacinamiento, aumentando el riesgo de la enfermedad y

favoreciendo la aparición de brotes como los sucedidos después de la guerra de Burundi en 1997, en Rusia en el mismo año y en Perú en 1998 (Figura 04).

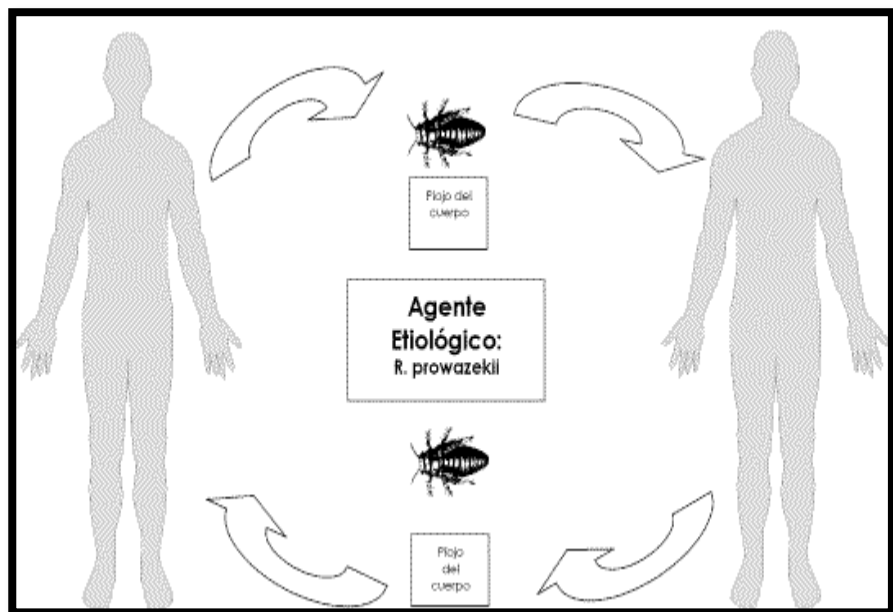


Figura 04: Ciclo de transmisión del tifus exantémico epidémico.

Fuente: Bermúdez *et al*, 2013.

El cuadro clínico aparece tras un periodo de incubación de 10-14 días y se caracteriza por fiebre alta, escalofríos, cefalea, artromialgia y anorexia. El 25-30% de los pacientes manifiesta tos seca, mareos, fotofobia, náusea, dolor abdominal y estreñimiento. El exantema suele aparecer en el 90- 95% de los casos y comienza en el tronco a los 4-7 días y

se extiende a extremidades, habitualmente respetando la cara, las palmas y plantas. Inicialmente es maculoso, rosado y desaparece con la presión, evolucionando a maculopapular de color más rojizo y, posteriormente, a petequeial y confluyente en los casos graves.

En estos casos, durante la evolución pueden producirse meningoencefalitis, neumonitis, miocarditis e insuficiencia renal. Suele existir elevación ligera de las transaminasas y en la mitad de los casos anemia normocítica y normocrómica, además de trombocitopenia moderadas. La mortalidad es elevada y se correlaciona con la edad, alcanzando un 60% en mayores de 50 años (Bermúdez, Lyons, García, Zaldívar, Gabster, y Arteaga, 2013).

B. Tifus murino o endémico

La enfermedad conocida como tifus murino, causada por *Rickettsia typhi*, tiene una distribución mundial con áreas endémicas extensas en los cinco continentes. En España hay evidencias de la existencia de casos en las provincias de Sevilla, Huelva, Murcia y las Islas Canarias. En 1931 se aisló

el microorganismo de pulgas y cerebro de rata capturadas cerca de pacientes afectados por la enfermedad. Muchos autores opinan que su importancia clínica y sanitaria se ha subestimado ya que en la actualidad el tifus murino constituye un paradigma de enfermedad infecciosa emergente.

Su importancia a nivel mundial queda reflejada en la elevada frecuencia con que se detectan anticuerpos específicos en diferentes estudios seroepidemiológicos, oscilando entre 3-36%.

En España, un estudio realizado en Sevilla, ha estimado una incidencia del 7% como causa etiológica de la fiebre de duración intermedia, si bien parece que este dato podría estar subestimado, teniendo en cuenta la existencia de casos de curso leve que son tratados en atención primaria y que no se computan al no llegar a las consultas de los especialistas (Hernández, Angel-Moreno y Santana, 2004).

Clásicamente, se ha considerado que los reservorios esenciales de *R. typhi* son las ratas peridomésticas *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*, actuando la pulga de rata

Xenopsylla cheopis como vector. La pulga se infecta al ingerir sangre de ratas infectadas. A continuación, la rickettsia se divide en su intestino y es excretada por las heces, lo que infecta a nuevas ratas a través de erosiones de la piel que el animal se produce al rascarse. Además, las pulgas infectadas transmiten el microorganismo por vía trans ovárica a toda su descendencia.

La transmisión a humanos es accidental por contaminación del lugar de la picadura o de lesiones cutáneas con heces de la pulga. Recientemente se ha constatado que la pulga de gato, *Ctenocephalides felis*, puede desempeñar un importante papel en el ciclo biológico y en la transmisión de *R. typhi* (Figura 05). La presencia de casos en áreas donde no se han detectado ni ratas ni sus pulgas infectadas por esta rickettsia, junto a la gran abundancia de gatos en muchos hogares (sin olvidar que *C. felis* tiene gran avidez por picar a personas) hacen que posiblemente nos encontremos ante un relevante problema de salud pública (Bermúdez *et al*, 2013).

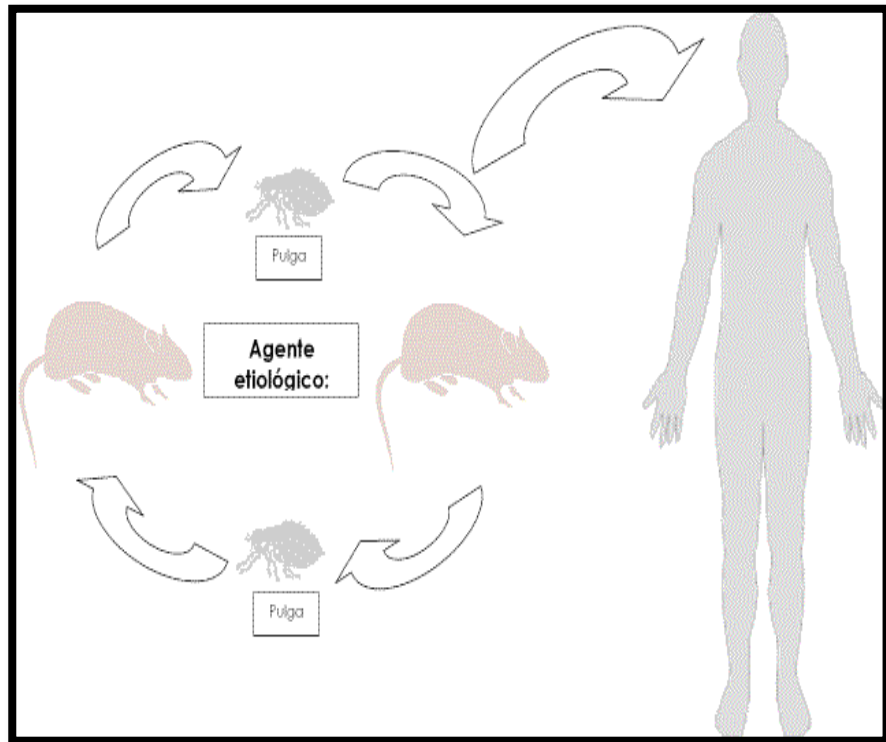


Figura 05: Ciclo de transmisión del Tifus murino o endémico.

Fuente: Bermúdez *et al*, 2013.

La mayor parte de los casos se producen entre mayo y octubre, que son los meses de mayor actividad de los vectores, aunque sólo un 3-30% de los pacientes refiere picadura de artrópodo en los días previos a la enfermedad. El periodo de incubación oscila entre 7-14 días. Desde el punto de vista clínico, los síntomas son bastante inespecíficos e incluyen fiebre, exantema, artromialgia y cefalea.

El exantema, que se produce en el 60-70% de los casos dura una media de 4 días, es maculopapuloso tenue y afecta al tronco y extremidades, respetando palmas y plantas. Los casos graves han sido descritos en el 2-4% de los casos.

Otro aspecto frecuente del tifus murino es la alteración en la bioquímica hepática con un alto porcentaje de pacientes que muestran hepatolisis moderada. Sin embargo la hepatitis y la colestasis son menos frecuentes. También se producen alteraciones hidroelectrolíticas en sangre como consecuencia del daño microvascular (disminución de los niveles de albúmina, potasio, sodio y calcio) y un alargamiento en los tiempos de coagulación, así como trombopenia.

La infección de la pulga a su huésped ocurre en el momento de alimentarse de él en el período de rickettsemia. El agente se multiplica en el intestino y los túbulos de Malpighi, sin causar daño aparente a la pulga. El vector elimina *R. typhi* por sus heces durante toda su vida, pero no por la saliva. No hay transmisión de la infección de *X. cheopis* a su progenie y la infección de nuevas generaciones de pulgas se produce siempre por medio de sus huéspedes.

La infección en otras especies de pulgas sigue las mismas pautas.

La infección de rata a rata se transmite por medio de su pulga, *X.cheopis* y del piojo *Polypulz spinulosa*. El agente sobrevive mucho tiempo en las heces de la pulga y la infección puede producirse dentro de las madrigueras contaminadas, por contacto con las mucosas (conjuntiva, boca) o por inhalación. La infección al hombre ocurre cuando la pulga de la rata (u otra pulga, como *C.felis*) lo pica y defeca sobre su piel. Al rascarse, el hombre introduce la materia fecal contaminada a través de la picadura u otra abrasión de la piel. Es probable que el hombre también pueda adquirir la infección por otras vías, tales como la conjuntival o por inhalación. Estos modos de transmisión son, sin embargo, poco importantes (Bermúdez *et al*, 2013).

2.4. Manifestación clínica de la rickettsiosis

La presentación clínica de las rickettsiosis del grupo tifus y sobre todo, del grupo de las fiebres manchadas, es poco específica, lo que puede llevar a confusión en el diagnóstico diferencial con otras

infecciones que existen en áreas endémicas como dengue, leptospirosis, influenza, fiebre tifoidea y bartonelosis.

Los síntomas y signos del tifus y en general de las demás rickettsiosis son variados y dependen del órgano afectado así como de la liberación de citoquinas en el torrente sanguíneo. Fiebre, tos, cefalea, escalofríos, mialgias, artralgias, anorexia, vómitos y dolor abdominal ocurren en diferentes proporciones en los pacientes afectados por tifus. Otros síntomas y signos incluyen la presencia de brotes cutáneos maculopapulares, purpúricos y petequiales; y síntomas asociados con el sistema nervioso central tales como convulsiones, ataxia, fotofobia; hepatomegalia e ictericia, también se pueden presentar en el grupo de las fiebres manchadas.

Todos estos síntomas son inespecíficos y, por tanto, el diagnóstico preciso depende de la sospecha clínica y epidemiológica con la confirmación por el laboratorio.

El Perú tiene zonas endémicas para el tifus epidémico en la sierra sur y central, se han encontrado zonas de transmisión de la rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas en zonas de altura y de selva. Sin embargo, debido al cuadro febril indiferenciado con el que se presenta (Cuadro 02), y que ocurre en zonas endémicas de

leptospirosis, enfermedad de Carrión, dengue, entre otras, no suele ser incluida como diagnóstico diferencial, en parte por el problema que implica su diagnóstico (Olano, Ramírez, Moscoso, Watts y Walker, 1998).

Cuadro 02: Manifestaciones clínicas del tifus exantémico, en porcentajes.

MANIFESTACIÓN CLÍNICA	PORCENTAJE EN PACIENTES
Cefalea	70-80%
Escalofríos	60-82%
Exantema	2 -70%
Tos	35-80%
Conjuntivitis	45-53%
Mialgia	46-71%
Artralgia	23-64%
Anorexia	35-80%
Náuseas	31-48%
Vómitos	10-40%
Dolor abdominal	11-31%
Hepatomegalia	13-24%
Ictericia	3-17%
Fotofobia	33%
Confusión	2 -8%
Estupor	2-4%
Convulsiones	4%
Ataxia	1%

Fuente: Olano *et al*, 1998.

2.5. Reservorio

La rickettsiosis presenta como reservorios gatos, perros y roedores, siendo el más importante las ratas.

2.5.1. Ratas urbanas

Las especies más usuales en los entornos urbanos son *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*. Estas dos especies de ratas son muy parecidas entre sí. Algunas de sus diferencias son morfológicas, otras residen en su comportamiento. La única diferencia entre las costumbres de las especies *R. rattus* y *R. norvegicus*, radica en el hecho de que la primera prefiere habitar en las partes altas de las casas, los graneros y las buhardillas, en tanto que a la segunda le resultan más gratos los subsuelos de los edificios, en los navíos las bodegas húmedas, galerías subterráneas, las alcantarillas, los pozos y las orillas de los ríos (Quintero *et al*, 2012).

A. *Rattus norvegicus*

La rata parda o de cloaca mide de 21 a 27 cm de longitud, la cola tiene de 17 a 22 cm y pesa de 210 a 520 gr. El cuerpo es tosco y la cola cubierta de escamas en anillo; el manto es gris oscuro en el dorso, el hocico es más romo y las

orejas más cortas que las del ratón de campo (*R. rattus*). Tiene hábitos nocturnos y es muy hábil en el agua, aunque, a diferencia de la rata negra no es buena trepadora.

Excava redes de túneles y cuevas. Es omnívora, aunque prefiere los cereales, huevos, carnes y animales pequeños. Su oído y olfato son excelentes. Es una especie gregaria, siendo cada individuo parte de un grupo jerárquico y disciplinado (Cuadro 03). Frecuentemente hay conflictos y a veces verdaderas guerras entre dos grupos. De acuerdo a Berkenhout (1769), se muestra la clasificación taxonómica de *R. norvegicus*:

Reino	:	Animalia
Filo	:	Chordata
Clase	:	Mamalia
Orden	:	Rodentia
Familia	:	Muridae
Subfamilia	:	Murinae
Género	:	<i>Rattus</i>
Especie	:	<i>Rattus norvegicus</i>

Cuadro 03: Diferencias físicas entre *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*.

Característica	<i>Rattus rattus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Tamaño (sin la cola)	7-11 cm	17-27 cm
Dimensiones de la cola	9-24 cm	15-23 cm
Tamaño corporal	Ligeramente más pequeño	Ligeramente más grande
Peso	125-250 g	180-600 g
Tamaño promedio de la camada	5 a 16 ejemplares	2 a 16 ejemplares
Longevidad (libertad)	18 meses	12 meses
Longevidad (cautividad)	2-3 años	3 años
Hostilidad	Menos agresiva	Más agresiva

Fuente: Sierra de baza, 2014.

B. Ciclo biológico

Las camadas nacen alrededor de 22 días después del apareamiento. Cada camada consta de 7-8 crías. Una rata hembra puede producir 10-12 camadas por año.

Las crías abren los ojos aproximadamente a los 12-14 días del nacimiento y dependen de la madre para alimentarse hasta que tienen unas 3 semanas. Las ratas pueden tener crías desde los 3-4 meses de edad viven en promedio un año, algunos alcanzan hasta los 3 años dependiendo de su distribución y hábitat (Figura 06).

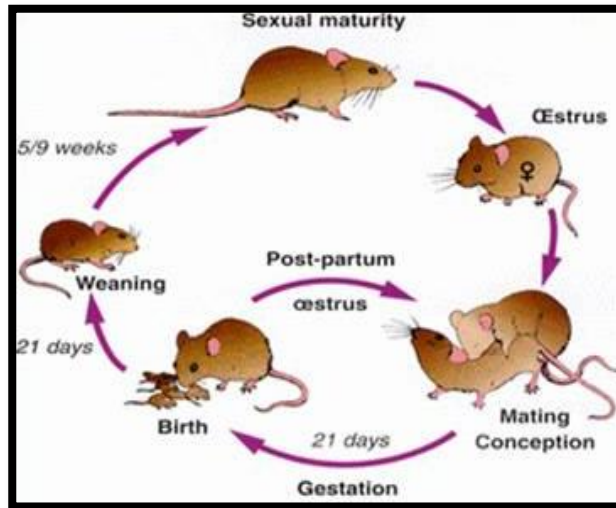


Figura 06: Ciclo biológico de *Rattus norvegicus*.

Fuente: Meehan, 1984.

2.6. Vectores

2.6.1. Tifus Epidémico

El papel de piojo del cuerpo *Pediculus humanus corporis* en la transmisión fue observado en 1909 por Charles Nicolle. Es un parásito estrictamente hematófago que normalmente vive en las ropas de su hospedero. Son sensibles a la deshidratación rápida por eso deben hidratarse consumiendo sangre (Bechah, Capo, Mege y Raoult, 2008).

2.6.2. Tifus Endémico

El vector más importante es la pulga de la rata *Xenopsylla cheopis*, quien mantiene el microorganismo en *R. rattus* y *R.norvegicus* (Nogueras, Cardeñosa, Sanfeliu, Muñoz, Font y Segura, 2006).

Las pulgas son generalizadas, pero no están adaptadas a un huésped específico y solo ocasionalmente pican a los humanos.

Las pulgas que parasitan más frecuentemente a los seres humanos son la del gato, la rata y la del hombre, *Ctenocephalides felis*, *Xenopsylla cheopis* y *Pulex irritans*, respectivamente. También es frecuente la picadura al hombre por pulgas típicas de otros animales, por ejemplo, la pulga del perro *Ctenocephalides canis* y la de las aves *Ceratophyllus gallinae* (Brouqui y Raoult, 2006).

2.7. Norma Sanitaria para los trabajos de Desinsectación, Desratización, Desinfección, Limpieza y Desinfección de reservorios de agua, Limpieza de ambientes y Limpieza de tanques Sépticos (R.M Nº 449-2001-SADM)

DE LOS TRABAJOS DE DESRATIZACIÓN

Artículo 7.- Trabajos previos

Previo a los trabajos de desratización, se debieran ejecutar las siguientes acciones:

- a) Identificar la zona donde se encuentra el local a ser tratado, para observar si cercano al mismo existen otros lugares en estado de abandono o en condiciones no higiénicas, si hay mercados o mercadillos o si en las cercanías de éste existen redes de desagüe con buzones sin tapa o acumulación de basuras.
- b) Tomar conocimiento de las características de los ambientes, ya sean abiertos o cerrados, del tipo de materiales de construcción del local, de su equipamiento, mobiliario, y del manejo de los residuos sólidos.
- c) Ubicar las madrigueras, huellas y rastros de roedores, heces y accesos de los roedores al lugar, cuando se trate de áreas abiertas.
- d) Determinar el tipo de roedores a ser eliminados su grado de infestación.

- e) Averiguar sobre los antecedentes del uso de rodenticidas en el local a controlar.
- f) Informarse sobre la manera en que se manejan los residuos domésticos.

Artículo 8.- Controles de carácter físico

En caso de infestación de roedores que se puedan controlar con medidas físicas, se debe recomendar al que solicita el trabajo que adopte las siguientes medidas:

- a) Limpiar, recolectar y disponer de los residuos domésticos, industriales, comerciales y del desmonte.
- b) Colocar elementos de protección para evitar el acceso de los roedores al local, como tapas a las cajas y a los buzones de la red de desagüe, rejillas, trampas, sellos hidráulicos, y reparar o cambiar las tuberías de desagüe que se encuentren rotas.
- c) Almacenar los alimentos y bebidas, así como la materia prima, en tarimas (parihuelas) o estantes, cuyo nivel inferior deberá estar a no menos de 0,20 metros del piso, y el nivel superior a 0,60 metros o más del techo, debiendo dejarse entre las filas de rumas y entre éstas y la pared un espacio libre de 0,50 metros

cuando menos. Dicho espacio libre deberá pintarse de color blanco para descubrir más rápidamente los excrementos, huellas y otros indicios de la presencia de roedores.

d) Colocar depósitos de basura con su correspondiente tapa.

2.8. Técnicas de diagnóstico laboratorial para rickettsiosis en *Rattus norvegicus* (Anaya y Morón, 2003)

El diagnóstico etiológico de la enfermedad infecciosa se establece desde el momento en que se aísla e identifica el agente causante. En algunas oportunidades no es posible este aislamiento, por lo que el diagnóstico debe establecerse mediante otros parámetros, como son aumento del título de anticuerpos, o bien el hallazgo de antígenos, componentes celulares o un producto metabólico específico del microorganismo.

El aislamiento y la identificación de bacterias y virus necesitan de la cooperación del médico tratante, quien debe familiarizarse con los conceptos generales para la obtención y transporte de las muestras clínicas.

2.8.1. Procesamiento de muestras para diagnóstico

En principio, las muestras adecuadas para el diagnóstico de las rickettsiosis son: suero, sangre con citrato, contenido de pápulas o vesículas y biopsia cutánea de la escara de inoculación. En el caso de afectación neurológica, también se debe recoger líquido céfalo raquídeo (Cuadro 04).

Cuadro 04: Muestras necesarias para el diagnóstico de la rickettsiosis.

MUESTRA	TRANSPORTE Tiempo y temperatura	CONSERVACIÓN Tiempo y temperatura	PRUEBA DIAGNÓSTICA
Suero	≤24 h, 2-8°C.	+24h, -20°C.	IFI
Sangre citratada	≤24 h, 2-8 °C.	+24h, -20°C.	PCR
Sangre con EDTA	≤24 h, 2-8°C.	+24h, -60/-80°C. (no varias descongelaciones)	PCR, Cultivo
Sangre heparinizada	≤24 h, 2-8°C.	+24h, -60/-80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo
LCR	≤24 h, 2-8°C.	+24h, -20°C.	PCR
Biopsia cutánea	≤24 h, 2-8°C.	+24 h,-20°C.	Microscopia, PCR
Contenido de pápulas/máculas	≤24 h, 2-8°C.	+24 h,-20°C.	PCR

Fuente: Anaya y Morón, 2003.

2.8.2. Inmunofluorescencia indirecta para diagnóstico de rickettsiosis

El diagnóstico de laboratorio del tifus se ha basado históricamente en la serología, inicialmente con la aglutinación con *Proteus vulgaris* cepa OX-19. Pero la sensibilidad y especificidad de esta prueba es muy baja. Pruebas serológicas más específicas incluyen la inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoperoxidasa, consideradas como “gold standard” para el diagnóstico serológico de tifus y rickettsias en general. Un título de 1:64 es considerado el valor mínimo para diagnóstico presuntivo de infección por rickettsia. Criterios para un diagnóstico de infección reciente por rickettsia son: (a) un aumento del título serológico al cuádruple del valor obtenido con la primera muestra; (b) un título > 1:256 en la etapa aguda (Anaya y Morón, 2003).

La inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él.

Esta técnica es un poco más compleja que la inmunofluorescencia directa (también conocida por sus siglas IFD), requiere más pasos y es posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es flexible en comparación a la inmunofluorescencia directa y debido a que es posible que un anticuerpo primario una a más de anticuerpo secundario, implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica (Anaya y Morón, 2003).

Esta técnica es posible, debido a que los anticuerpos constan de dos partes, una región variable (que es la que reconoce al antígeno) y una región constante (que forma el esqueleto y estructura básica de la molécula de anticuerpo).

Es importante notar sin embargo, que esta división es artificial y que en realidad la molécula de anticuerpo se encuentra formada por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos livianas, estas últimas son las que contienen la región variable. Es posible que existan varios anticuerpos que reconozcan diferentes antígenos (es decir que tengan diferentes regiones variables) pero que

compartan la misma región constante. Todos estos anticuerpos con diferentes especificidades pueden ser reconocidos a su vez por un único anticuerpo secundario que reconozca la región constante. Esto ahorra el esfuerzo técnico y el costo de modificar cada uno de los anticuerpos primarios para acarrear el fluoróforo (Anaya y Morón, 2003).

A. Fundamento del método

La prueba de Inmunofluorescencia Indirecta es una reacción antígeno-anticuerpo que se desarrolla sobre una fase sólida (lámina de inmunofluorescencia) en el cual se impregna el antígeno cuyos epítopes reconocerán a los anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente (reacción antígeno-anticuerpo). Dicha reacción se hace visible al adicionar el anticuerpo anti-rat total (IgM+IgA+IgG) ó anticuerpo anti-rat IgG conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína). La actividad enzimática se visualiza en el microscopio de inmunofluorescencia mediante la formación de corpúsculos fluorescentes intracitoplasmáticos (Anaya y Morón, 2003).

B. Tipo de muestra

Suero

C. Conservación de muestras antes del análisis

Las muestras de suero recepcionadas se conservan por 24 a 48 horas antes de su procesamiento, este tiempo está incluido en el plazo establecido en el catálogo de servicios para la emisión de resultados.

La manipulación y conservación de muestras en el laboratorio de Metaxénicas Bacterianas se efectuó según lo establecido en el protocolo del Centro Nacional de Salud Pública N° 006 (Anaya y Morón, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales de laboratorio y equipos

3.1.1. Material de campo

- Bolsas plásticas para recolección
- Bolso o mochila Manzananas
- Guantes quirúrgicos
- Guantes de goma gruesa
- Mascarillas descartables
- Cinta Masking-tape 11/2
- Papel toalla absorbente
- Trampas Tomahawk ®
- Tablero encuestador
- Alcohol, frasco x 1 lt
- Guantes de cuero
- Jabón de manos
- Algodón
- Cebo

3.1.2. Material de laboratorio

- Tubo para extracción de sangre de 16 x 100 sin anticoagulante
- Jeringa descartable y estéril de 1 ml con aguja de tuberculina
- Jeringa descartable y estéril de 5 ml con aguja de 21x1
- Papel absorbente plastificado uso laboratorio 50x50
- Micropipeta unicanal de rango variable 100 - 1000 μ l
- Guante quirúrgico estéril largo, descartable, N° 6 ½
- Micropipeta unicanal de rango variable 20 - 200 μ l
- Pipeta unicanal de rango variable 0.5 - 10 μ l
- Tijera de metal de 7" con mango de plástico
- Ketamina 10% (forma comercial HALATAL)
- Bolsa de bioseguridad, tamaño mediano
- Aguja para extracción de sangre n°21x1
- Bolsa de bioseguridad tamaño grande
- Porta pipetas de polietileno
- Microplacas polysoport
- Campana de vidrio
- Criovial de 2 ml
- Cloroformo

3.1.3. Reactivos para montaje IFI (INS)

- Solución separadora de células mononucleares (frasco x 500 ml)
- Suero control negativo Rickettsia rat x 150 µl
- Suero control positivo Rickettsia rat x 150 µl
- Alcohol absoluto (frasco x 2,5 lt)
- Skim milk x 500 gr
- Acetona x 2.5 lt
- Anti-rat-IgG marcado con Isotocianato de fluoresceína (FITC)
- Solución diluyente de conjugado (ver Anexo 03)
- Glicerina tamponada pH 8,5 (ver Anexo03)
- Solución diluyente de suero (ver Anexo 03)
- Solución de Azul de Evans (ver Anexo 03)
- Buffer fosfato salino pH 7,4 (ver Anexo 03)
- Agua destilada

3.1.4. Equipos

- Microscopio de Epifluorescencia
- Cooler conservador de 5 lt
- Refrigerador ICE LINE

- Microscopio confocal
- Secador o ventilador
- Balanza electrónica
- Congelador -70°C
- Reloj cronómetro
- Potenciómetro
- Anaqueles
- Balanza
- Estufa

3.2. Área de estudio

El área de estudio fue el sector Pampas de Viñani en el distrito Coronel Gregorio Albarracín, provincia y región de Tacna ubicada a S18°03'30.5" W070° 15'10.2" elevación 475 m.

3.3. Lugar de experimentación

- Laboratorio de Microbiología y Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNJBG-Tacna.
- Laboratorio de referencia regional, DIRESA -Tacna
- Laboratorio de Metaxénicas Bacterianas, Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud, Jesús María - Lima.

3.4. Tipo de estudio (Supo, 2012)

Diseño descriptivo transversal analítico.

3.5. Tipo de muestra

Biológica, *Rattus norvegicus*.

3.6. Material de estudio

Suero de *Rattus norvegicus*.

3.7. Muestreo (Mills, Childs, Ksiazek y Peters, 1998)

Durante 24 noches de muestreo con 20 trampas Tomahawk®, se capturaron roedores en 5 diferentes puntos (ver Anexo 07): A (S18°03'34.5" W070° 15'06.3" elevación 471 m), B (S18°03'41.0"W070° 15'07.0" elevación 472 m) y C (S18°03'42.0" W070° 15'08.5" elevación 472 m) correspondientes a espacios de vertederos, así mismo en D (S18°03'44.3" W070° 15'10.4" elevación 471 m) y E (S18°04'31.5" W070° 25'14.5" elevación 470 m) correspondientes a espacios de peridomicilio en la proximidad de la avenida ecológica ubicada en el Asentamiento Humano Pampas de Viñani sector I en el distrito coronel Gregorio Albarracín de la ciudad de Tacna.

3.8. Metodología de la investigación

3.8.1. Procedencia del Material biológico

Los muestreos se efectuaron en el sector Pampas de Viñani, ubicado en el distrito de Gregorio Albarracín, a S 18°03'30.5" W 070° 15'10.2" elevación 475 m, provincia de Tacna (ver Anexo 04 y 05).

3.8.2. Selección de los puntos de muestreo (Mills *et al*, 1998)

Se realizó coordinaciones para obtener los permisos necesarios con la autoridad distrital y se revisó los protocolos estandarizados de uso y cuidado de animales, para efectuar la investigación.

La captura de roedores se realizó en la proximidad a la avenida ecológica en el sector Pampas de Viñani del distrito Coronel Gregorio Albarracín, con el uso del sistema de posición global (GPS) para registrar la latitud y longitud exactas. Se tomó énfasis en depósitos municipales para basura llamados en este estudio como vertederos y peridomicilio, que presentaban afluencia de roedores sinantrópicos.

3.8.3. Formación de brigadas de muestreo (Anaya *et al*, 2012)

Para el trabajo de campo se formó 3 brigadas de muestreo en la cual se incluyó 5 personas por brigada, se utilizó 20 trampas Tomahawk® que fueron colocadas entre las 18:00 horas y 19:00 horas y fueron recogidas a las 05:00 horas del día siguiente (ver Anexo 09).

3.8.4. Método de trampeo y muestreo de pequeños mamíferos (Mills *et al*, 1998)

A. Aspectos éticos

Los procedimientos llevados a cabo en los roedores siguieron lo indicado por el Comité de Ética en la Experimentación Animal de la sede de investigación universitaria de la Universidad Antioquia y la dirección de salud ambiental de Tacna.

B. Bioseguridad del personal de captura y procesamiento de roedores

Las medidas profilácticas que se tomaron en cuenta durante las capturas, procesamiento, sangrado y disección de roedores se ejecutaron al conocer las rutas potenciales de

infección y se evitó las situaciones que conduzcan a transmisión alguna.

Las precauciones incluyeron: reducir al mínimo la exposición a las heces de los roedores; evitar la creación de aerosoles; usar ropa protectora; anestesiarse profundamente a los animales antes de manipularlos, y desinfectar adecuadamente las superficies de trabajo, equipo y ropa.

B.1. Desinfectantes

Se usó desinfectantes simples contra el hantavirus (principal agente infeccioso ante la exposición), para reducir el riesgo de infección con las siguientes soluciones diluidas de hipoclorito al 10%, Lysol de grado hospitalario al 5% y detergentes comerciales y otros desinfectantes comerciales.

Se usaron para:

- Limpieza de guantes de goma después de manipular trampas que contuvieron roedores o desechos de roedores.

- Descontaminación de las trampas que contuvieron roedores o desechos de dichos animales.
- Limpieza de manos enguantadas después de manipular cada roedor o de realizar la disección.
- Sumergir y desinfectar los instrumentos utilizados en la disección.
- Limpieza de las superficies de trabajo y otros materiales que puedan haberse contaminado al trabajar con los roedores.

B.2. Ropa protectora y equipo

Para la colocación de trampas por parte del personal se siguió los protocolos establecidos, que incluyeron: pantalones largos, medias, zapatos y guantes de goma gruesa. Una medida de seguridad permanente fue el uso de mandiles protectores, que se quitaron después de finalizar el trampeo y procesamiento de los animales.

B.3. Seguridad respiratoria

Se utilizó un cubreboca correctamente ajustado y así se evitó el ingreso de aire contaminado con partículas y otras procedentes del animal de experimentación.

C. Protocolo para remoción de trampas (Mills *et al*, 1998)

C.1. Preparación para la expedición de trampeo

C.1.1. Preparación de cebo

Se preparó un cebo con 100 gr de avena arrollada mezclada con una cantidad de 20 gr de maní y 5 ml de vainilla (ver Anexo 01).

C.1.2. Preparación de rótulos para crioviales.

Se utilizó rótulos preimpresos bajo la denominación RT-01 hasta RT-65, con información de número de animal, en adhesivos para las etiquetas (ver Anexo 17).

C.1.3. Cinta blanca para numeración de las trampas

Se utilizó cinta de 10 cm con numeración del 1 al 20 para identificar cada trampa colocada.

C.1.4. Colocación de trampas

Se estableció un cronograma de muestreo con salidas de campo durante 24 noches con el uso de 20 trampas Tomahawk® (ver Anexo 08).

Se colocó y cebó todas las trampas en los siguientes puntos codificados y asignados por el sistema de posición global (ver Anexo 07): A (S18°03'34.5" W070° 15'06.3" elevación 471 m) ,B (S18°03'41.0"W070° 15'07.0" elevación 472 m) y C (S18°03'42.0" W070° 15'08.5" elevación 472 m) correspondientes a espacios de vertederos, así mismo en D (S18°03'44.3" W070° 15'10.4" elevación 471 m) y E (S18°04'31.5" W070° 25'14.5" elevación 470 m) correspondientes a espacios de peridomicilio y fueron colocadas entre las 18:00 horas y 19:00 horas, siendo recogidas a las 05:00 horas del día siguiente.

Vertederos

Las trampas fueron colocadas alejadas de la vista de caminos, veredas, rutas u otras áreas de actividad humana, evitando que las personas y perros destruyan las trampas o tropiecen accidentalmente con ellas.

La observación se efectuaba a 15 m. para no interferir con la actividad de los roedores nocturnos, cerca de los vertederos municipales.

Peridomicilio

Se colocaron trampas cerca de las viviendas, paralelamente a las paredes, superficies verticales y al finalizar cada línea de trampas se completó el formulario (ver Anexo 02).

D. Recolección y transporte de los roedores

Los miembros del equipo provistos de ropa protectora, pantalones largos, mandil, zapatos y guantes de goma gruesa, inspeccionaron las trampas y las que contenían roedores capturados fueron manipuladas cuidadosamente

para colocarlas dentro de una bolsa de polietileno doble oscura con una perforación para evitar asfixia del roedor.

Las bolsas fueron transportadas al baúl del auto después de colocar a los animales en el vehículo (ver Anexo 11), se procedió a lavar los guantes de goma minuciosamente con jabón y agua, luego las manos desnudas y se completó el formulario de recuento de trampas (ver Anexo 02). Finalmente las bolsas fueron trasladadas en dirección al Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNJBG, donde adicional a las medidas de bioseguridad mencionadas para la apertura de la bolsa, se usó un cubrebocas.

E. Anestesia

El procesamiento se realizó en el recinto cerrado del Bioterio. Como la guía recomienda se usó anestésico por inhalación, en este caso cloroformo empapado en un trozo de algodón dentro de la campana de vidrio (ver Anexo12), inicialmente fue difícil expulsar a los animales de las trampas Tomahawk ® motivo por el cual los roedores capturados en estas trampas fueron anestesiados colocando la trampa entera en la bolsa plástica que contenía una gasa empapada

en cloroformo, con posterior uso de ketamina 10% en una dosis para pesos de 100 gr o menos de 0,1 ml y para mayores de 100 gr de 0,3 ml administrado vía intramuscular, considerando el margen terapéutico de error (ver Anexo 12).

Finalmente se observó al roedor inmóvil sin respuesta a estímulo, colocándolo sobre una superficie limpia para el procesamiento.

F. Identificación de roedor y obtención de medidas estándar (Mills *et al*, 1998)

Se trabajó en grupos de 4 personas para aumentar la eficiencia en el procesamiento. Los datos de identificación se compilaron en formularios y registraron en un documento estandarizado. También se consideró las siguientes medidas estándar asignadas como variables:

Procedencia

Al verificar el éxito de captura, se tomó apunte si es que el lugar de captura correspondía a vertedero o peridomicilio de acuerdo a los criterios establecidos.

El sexo

Para los machos, se ubicó los testículos que, en algunos casos, habían descendido dentro del escroto. Para las hembras, se ubicó la vagina que en algunos casos no estaba expuesta a simple vista (ver Anexo 13).

Lesión

Se registró la observación de cualquier cicatriz que evidenciaba el cuerpo (ver Anexo 13), especialmente en las orejas y cola, codificadas como presencia y ausencia.

Longitud total

Primero se colocó el animal sobre una superficie con la parte ventral hacia arriba de modo que el cuerpo y la cola estén derechos, pero no estirados. Se midió la distancia desde la punta de la nariz a la punta de la parte carnososa de la cola (ver Anexo 13).

Peso

Se registró los datos obtenidos del pesaje con la ayuda de una balanza electrónica (ver Anexo 13).

Edad

Se registró subjetivamente según las medidas y características de pelaje y tamaño como juvenil y adulto.

G. Obtención de sangre de los roedores capturados

G.1. Punción cardíaca (Mills *et al*, 1998)

Se utilizó una aguja de 3,75 cm y 22 gr en una jeringa de 3 ml; seguidamente se colocó el animal sobre una superficie plana, con la región ventral hacia arriba. Se desinfectó el abdomen y el tórax con alcohol y se ubicó la posición del latido del corazón con el dedo índice de la mano izquierda.

Con la mano derecha en la protuberancia xifoidea se insertó la aguja justo debajo de este punto y presionando la aguja dentro de la cavidad torácica en un ángulo de 20°, penetrando al corazón obteniendo la suficiente cantidad de sangre (ver Anexo 14).

Se llenó los tubos vacutainer para suero con la cantidad de sangre establecida, posteriormente se descartó la jeringa y aguja dentro de un recipiente para material punzante (ver Anexo 14). Finalmente se limpió con una toalla de papel, gasa y desinfectante el área de trabajo.

H. La autopsia de los roedores capturados (Mills *et al*, 1998)

Los roedores que no murieron desangrados fueron sometidos a un procedimiento de sobredosis de Ketamina 10% para la eutanasia.

I. Limpieza del área de toma de muestra (Mills *et al*, 1998)

El área de procesamiento fue cuidadosamente descontaminada, siguiendo paso a paso las instrucciones descritas por Mills *et al*, (1998). Los contactos con el laboratorio referencia regional recibieron las bolsas de peligro biológico que contenían basura para descarte de acuerdo con regulaciones local y estatal.

J. Descontaminación de las trampas (Mills *et al*, 1998)

Se preparó un balde plástico de 20 lt que contenía 15 lt de Lysol de calidad industrial en una dilución 1:20 y 5 lt de agua, para el lavado de las trampas y se enjuagó con 2 baldes de 20 lt.

3.9. Metodología de laboratorio

3.9.1. Obtención de suero (Anaya y Morón ,2003)

El procesamiento de los tubos con muestras sanguíneas se efectuó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias, siguiendo el protocolo estándar para obtención de suero, centrifugando las muestras sanguíneas a 2500 r.p.m. durante 5 minutos (ver Anexo 15).

Se separó el suero con el uso de la micropipeta unicanal de rango variable 100 - 1000 µl hacia el criovial un volumen de 250 µl para su posterior congelación en cadena de frío a -20°C (ver Anexo 16).

3.9.2. Conservación y transporte de muestras (Anaya y Morón, 2003)

La conservación de las muestras séricas se realizó en un refrigerador ICE LINE, a una temperatura de -20°C hasta obtener la totalidad de muestras séricas, siendo las muestras eventualmente colocadas en un contenedor (cooler) con 4 gel pack para su envío al laboratorio de Metaxénicas Bacterianas del Instituto Nacional de Salud siguiendo el protocolo de embalaje señalado en la guía de diagnóstico laboratorial de rickettsiosis (ver Anexo 17).

3.9.3. Prueba de Inmufluorescencia indirecta para diagnóstico de rickettsiosis (Anaya y Morón, 2003)

A. Procedimiento

Se diluyó el suero en solución de bloqueo (PBS pH 7,2 +/- 0,2 con 3% de leche en polvo sin grasa a una dilución de 1:64 (2 µl de suero en 126 µl de solución tampón fosfato + leche descremada), tanto el suero control positivo como el suero control negativo. Seguidamente se retiró las láminas impregnadas con rickettsias del congelador y se llevó a temperatura ambiente por 30 minutos antes de realizar la

prueba (ver Anexo 20). Se removió la condensación de agua de la superficie de las láminas.

Se agregó 10 μ l de las muestras de suero diluido en solución tampón fosfato mas leche descremada (solución de bloqueo) a cada pocillo de las láminas, se incubó en una cámara húmeda a 37 °C +/- 1 por 30 minutos. Se retiró las láminas de la cámara de incubación húmeda y lavó con solución tampón fosfato pH 7,2 +/- 0,2, cambiando la solución tampón dos veces por un tiempo total de 20 minutos.

Luego del secado de las láminas a temperatura ambiente se agregó en cada pocillo el conjugado anticuerpo anti-rat total y anti-rat Ig G unido a FITC y Azul de Evans a una dilución de 1:50 en solución tampón (cada lote de conjugado fue titulado previamente). Se agregó 10 μ l del conjugado a cada pocillo de la lámina, finalmente se incubó por 30 minutos en cámara húmeda a 37 °C +/- 1. En la habitación oscura se retiró las láminas de la cámara de incubación húmeda y se procedió a lavar con solución tampón fosfato agitando suavemente, repitiendo esto dos

veces por un tiempo de 20 minutos. Se dejó secar y se procesó el montaje con glicerol.

B. Confirmación de caso

La observación se llevó a cabo en un microscopio de inmunofluorescencia, donde se identificó corpúsculos fluorescentes intracitoplasmáticos a un objetivo 40X a los que se determinó como casos positivos para un título de 1:128 (ver Anexo 18, 19 y 21). Finalmente se registró los casos positivos y negativos en una tabla.

3.10. Análisis estadístico (Supo, 2012)

Se realizó un análisis descriptivo de la infección por rickettsias ingresando los datos al paquete estadístico SPSS.v.22. Donde se construyó gráficas de frecuencia para señalar cantidades y porcentajes. También, se hizo un análisis de confrontación de variables, construyendo tablas de contingencia con el objeto de discernir la relación entre la infección por *Rickettsia sp.* (infección detectada por IFI) con las siguientes variables: procedencia (codificado como vertedero y peridomicilio), sexo (macho y hembra), edad (juvenil y adulto), lesión (presencia y ausencia), peso y longitud total.

IV. RESULTADOS

4.1. Captura e identificación de roedores

se capturaron roedores en 5 diferentes puntos (ver Anexo 04, 05, 06 y 07): A (S18°03'34.5" W070° 15'06.3" elevación 471 m), B (S18°03'41.0" W070° 15'07.0" elevación 472 m) y C (S18°03'42.0" W070° 15'08.5" elevación 472 m) correspondientes a espacios de vertederos, así mismo en D (S18°03'44.3" W070° 15'10.4" elevación 471 m) y E (S18°04'31.5" W070° 25'14.5" elevación 470 m) correspondientes a espacios de peridomicilio en la proximidad de la avenida ecológica ubicada en el Asentamiento Humano Pampas de Viñani sector I en el distrito Coronel Gregorio Albarracín Lanchipa en ciudad de Tacna, lo que representó un éxito de captura del 14,79 %.

Los roedores capturados fueron en total 71, siendo 65 (91,55%) clasificados como *Rattus norvegicus* y 6 (8,45 %) como *Rattus rattus*.

4.1.1. Captura de roedores por puntos de muestreo

Tabla 01: Roedores capturados en diferentes puntos de muestreo.

Puntos de muestreo	N° roedores	N° roedores (%)
Vertedero (A)	14	19,72
Vertedero (B)	8	11,27
Vertedero (C)	22	30,98
Peridomicilio (D)	11	15,49
Peridomicilio (E)	16	22,54
Total	71	100

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 07, se aprecia el número de roedores capturados, expresado en porcentajes, en los puntos A (S18°03'34.5" W070° 15'06.3" elevación 471 m) ,B (S18°03'41.0"W070° 15'07.0" elevación 472 m) , C (S18°03'42.0" W070° 15'08.5" elevación 472 m) ,D (S18°03'44.3" W070° 15'10.4" elevación 471 m) y E (S18°04'31.5" W070° 25'14.5" elevación 470 m), mostrando que en el punto C se logró una captura de 30,98 % sobresaliendo entre los otros puntos referidos (ver Anexo 10).

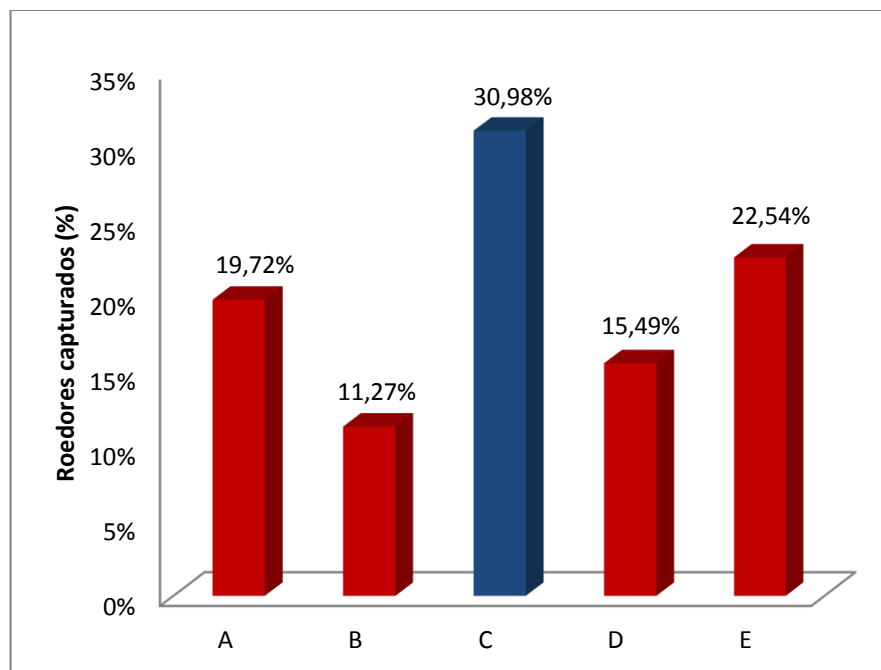


Figura 07: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de la captura en diferentes puntos de muestreo.

4.1.2. Identificación de roedores capturados

Tabla 02: Identificación de roedores.

Especies	N° roedores	N° roedores (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	65	91,55
<i>Rattus rattus</i>	6	8,45
Total	71	100

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 08, se aprecia el resultado de la identificación de los roedores capturados expresado en porcentajes, mostrando que el 91,55 % corresponde a la especie *Rattus norvegicus* y el 8,45 % a *Rattus rattus*. Predominando la especie *R. norvegicus*.

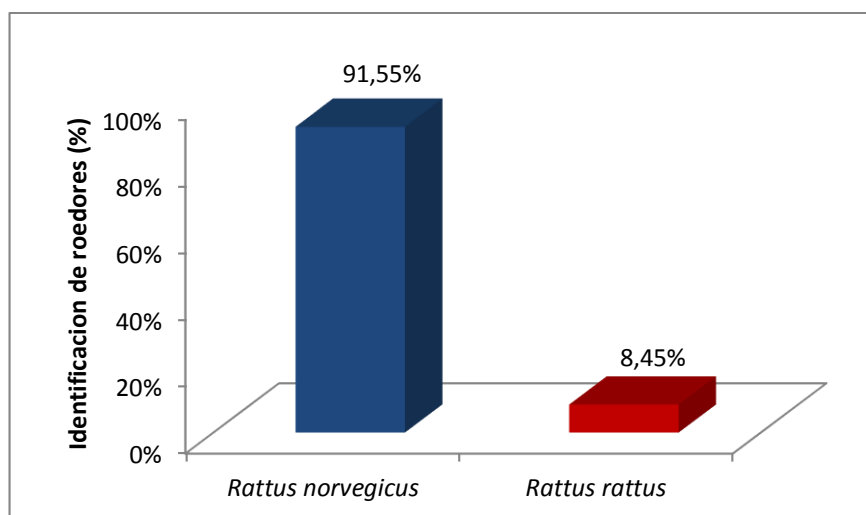


Figura 08: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de la identificación de roedores.

4.2. Infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus*

Mediante Inmunofluorescencia indirecta se determinó la infección por *Rickettsia sp.* en los roedores (*Rattus norvegicus*) capturados. La frecuencia de casos positivos fue de 12,31 % y la de casos negativos fue de 87,69 %.

Tabla 03: Casos positivos y negativos a infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI.

IFI *	N° roedores	N° roedores (%)
IFI (+) **	8	12,31
IFI (-) ***	57	87,69
Total	65	100

Fuente: Elaboración propia.

* Inmunofluorescencia indirecta

** Caso positivo a infección rickettsial por IFI

*** Caso negativo a infección rickettsial por IFI

En la Figura 09, se aprecia que la frecuencia de casos positivos a infección por *Rickettsia sp.* fue de 12,31 % y la de casos negativos fue de 87,69 %.

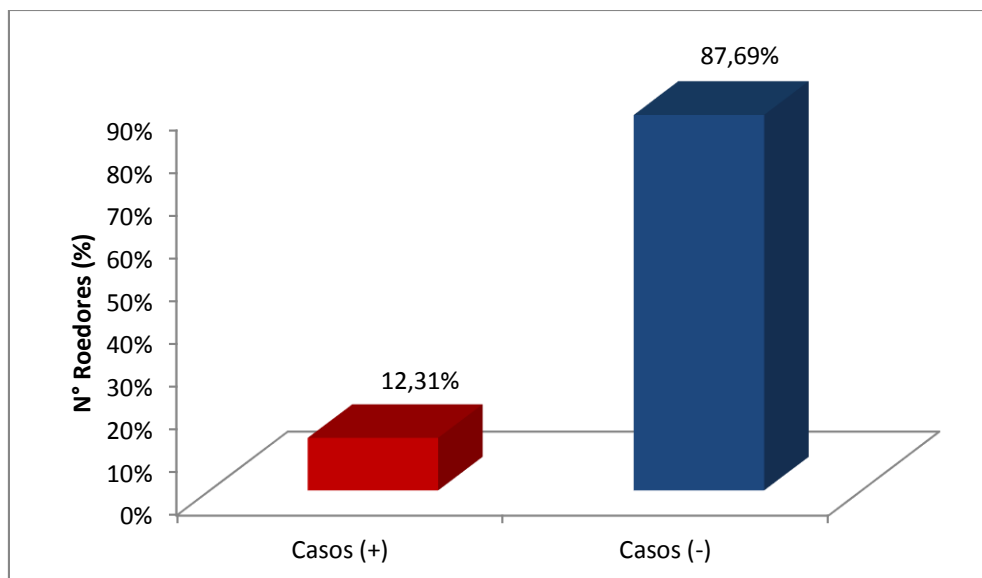


Figura 09: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI en muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

4.3. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y otras variables obtenidas de *Rattus norvegicus*

Se confrontó los casos de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI, con cada una de las variables consideradas en este estudio. Para el análisis se construyeron las siguientes tablas de contingencia.

4.3.1. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y la variable procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio)

Tabla 04: Confrontación entre los casos de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

Infección por <i>Rickettsia sp.</i>	Procedencia		Total
	Vertedero	Peridomicilio	
Nº casos	5	3	8
Nº casos (%)	62,5%	37,5%	100,0%

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 10, se aprecia el número de casos de infección determinada por IFI en relación a la procedencia de las muestras con un recuento de 5 casos para procedencia vertedero y para procedencia peridomicilio de 3.

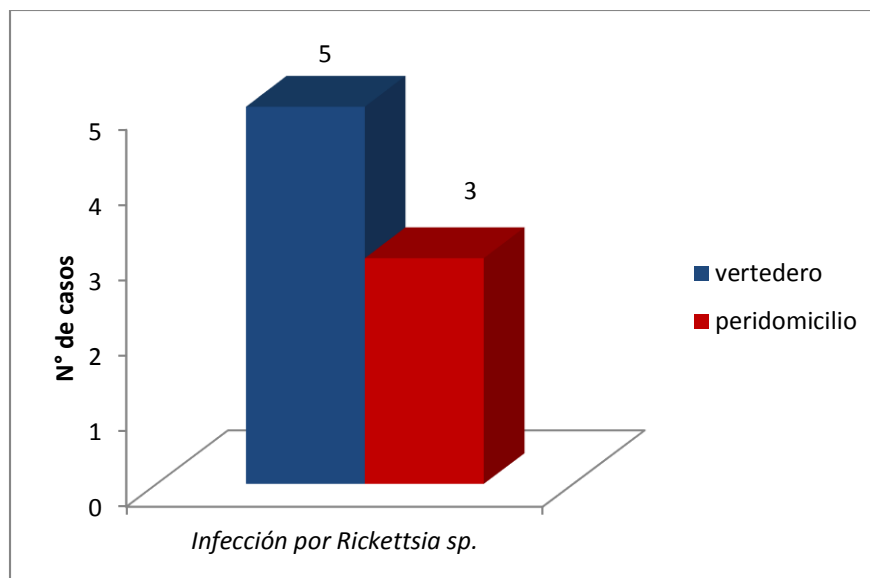


Figura 10: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

En la Figura 11, se aprecia el número de casos expresado en porcentajes de infección determinada por IFI en relación a la procedencia de las muestras con un porcentaje de 62,5% casos para procedencia vertedero y para procedencia peridomicilio de 37,5%.

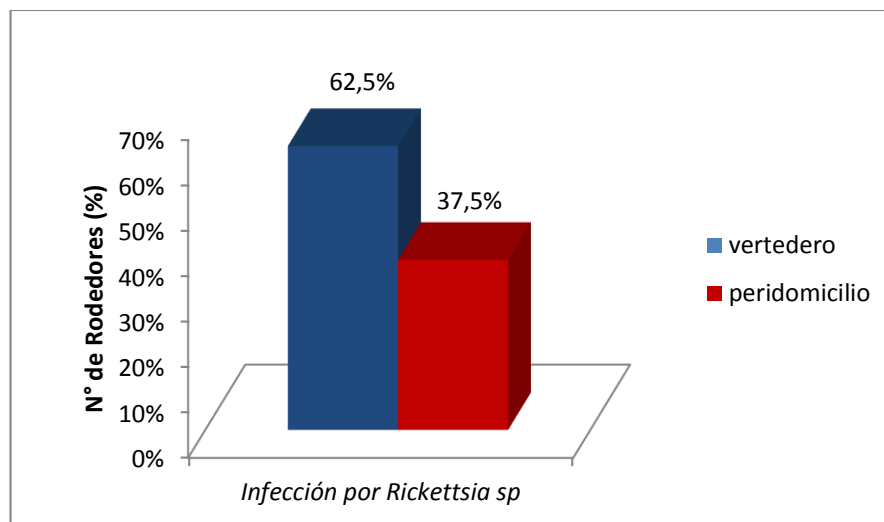


Figura 11: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y procedencia (codificada como vertedero y peridomicilio) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

4.3.2. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y la variable sexo (codificada como macho y hembra)

Tabla 05: Confrontación entre los casos de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y sexo (codificada como macho y hembra) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

Infección por <i>Rickettsia sp.</i>	Sexo		Total
	Macho	Hembra	
Nº casos	3	5	8
Nº casos (%)	37,5%	62,5%	100,0%

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 12, se aprecia el número de casos de infección determinada por IFI en relación al sexo de las muestras con un recuento de 3 casos para sexo macho y para sexo hembra de 5.

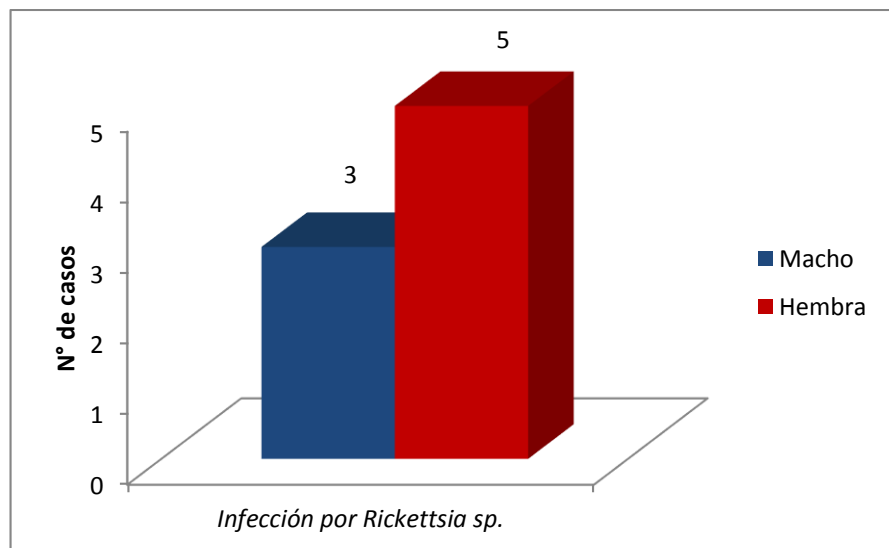


Figura 12: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y sexo (codificada como macho y hembra) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

En la Figura 13, se aprecia el número de casos expresado en porcentajes de infección determinada por IFI en relación al sexo de las muestras con un porcentaje de 37,5 % casos para sexo macho y para sexo hembra de 62,5 %.

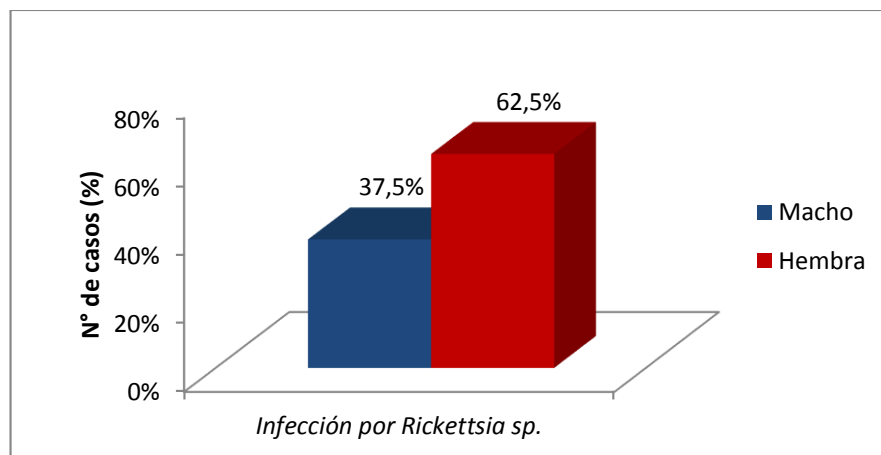


Figura 13: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y sexo (codificada como macho y hembra) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

4.3.3. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y la variable edad (codificada como juvenil y adulto)

Tabla 06: Confrontación entre los casos de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y edad (codificada como juvenil y adulto) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

Infección por <i>Rickettsia sp.</i>	Edad		Total
	Juvenil	Adulto	
Nº casos	1	7	8
Nº casos (%)	12,5%	87,5%	100,0%

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 14, se aprecia el número de casos de infección determinada por IFI en relación a la edad de las muestras con un recuento de 1 caso para edad juvenil y para edad adulto de 7 casos.

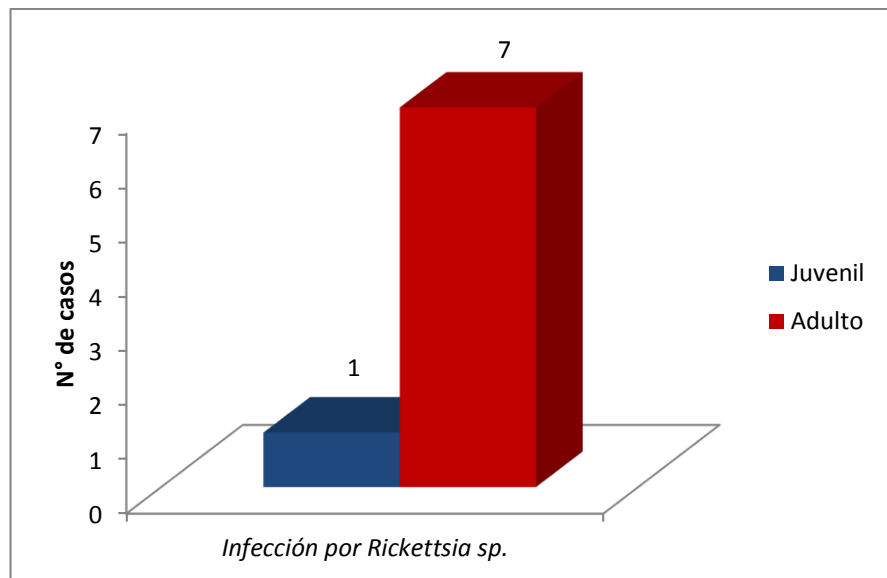


Figura 14: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y edad (codificada como juvenil y adulto) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

En la Figura 15, se aprecia el número de casos expresado en porcentajes de infección determinada por IFI en relación a la edad de las muestras con un porcentaje de 12,5% casos para edad juvenil y para edad adulto de 87,5%.

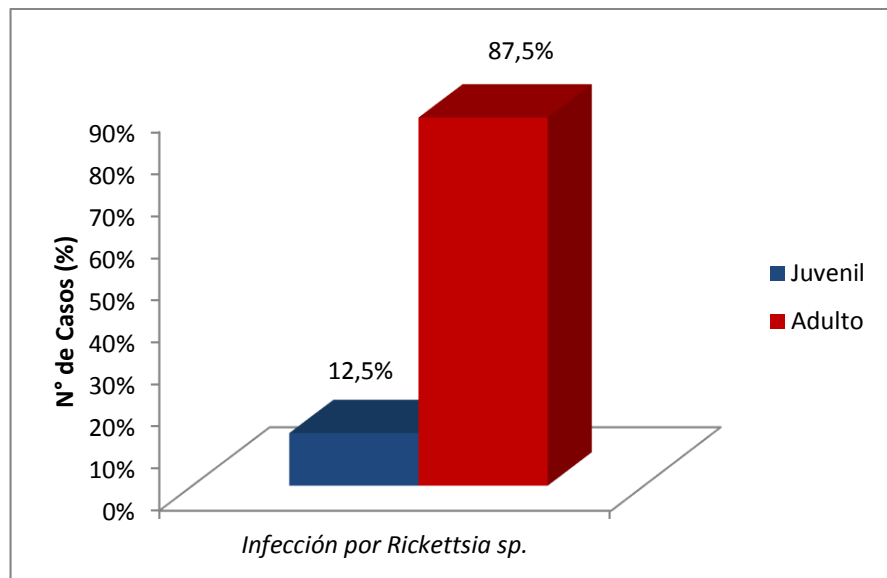


Figura 15: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y edad para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

4.3.4. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y la variable lesión (codificada como presencia y ausencia)

Tabla 07: Confrontación entre los casos de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y lesión (codificada como presencia y ausencia) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

Infección por <i>Rickettsia sp.</i>	Lesión		Total
	Presencia	Ausencia	
N° casos	0	8	8
N° casos (%)	0%	100,0%	100,0%

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 16, se aprecia el número de casos de infección determinada por IFI en relación a presencia de lesión en las muestras con un recuento de 0 casos para lesión presente y para lesión ausente de 8.

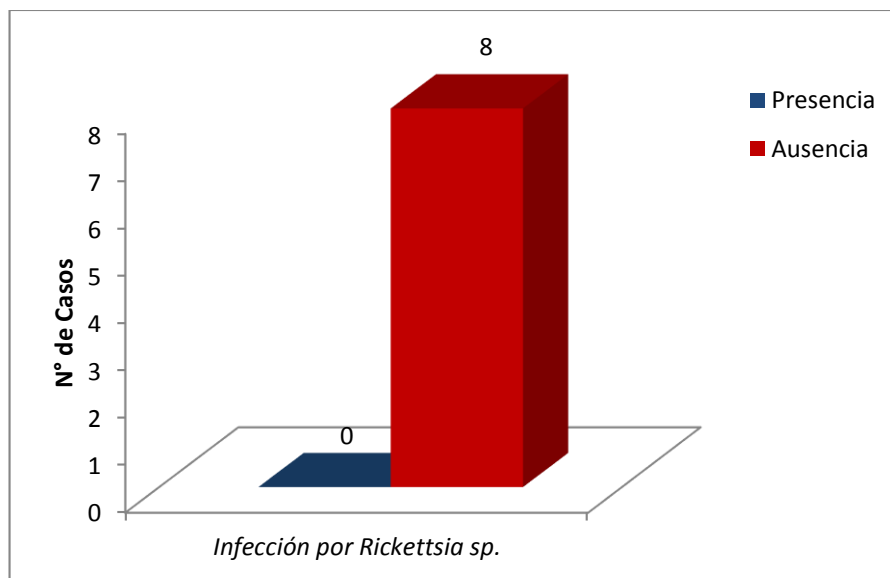


Figura 16: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y lesión (codificada como presencia y ausencia) para las muestras de *Rattus norvegicus*.

En la Figura 17, se aprecia el número de casos expresado en porcentajes de infección determinada por IFI en relación a la presencia de lesión en las muestras con un porcentaje de 0 % casos y para ausencia de lesión en las muestras de 100 %.

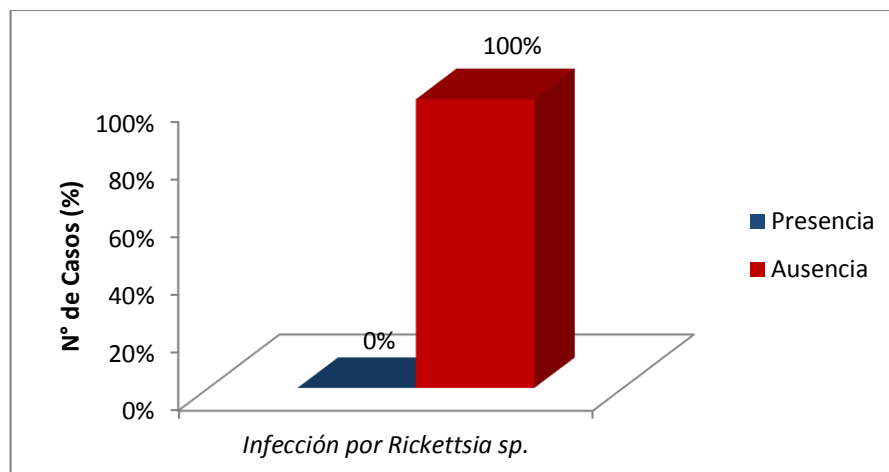


Figura 17: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y lesión (codificada como presencia y ausencia) para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

4.3.5. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y la variable peso

Tabla 08: Confrontación entre los casos de infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y peso para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

Infección por <i>Rickettsia sp.</i>	Peso (gr)								Total
	<= 87	88 - 112	113 - 137	138 - 162	163 - 187	188 - 212	213 - 237	238+	
N° casos	0	0	1	1	2	3	1	0	8
N° casos (%)	0,0%	0,0%	12,5 %	12,5 %	25,0 %	37,5 %	12,5 %	,0%	100%

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 18, se aprecia el número de casos de infección determinada por IFI en relación al peso en las muestras con un recuento de 0 casos para pesos de 87 gr o menos, 0 casos para pesos entre 88 - 112 gr, entre 113 - 137 gr de 1 caso, entre 138 - 162 gr de 1 caso, entre 163 - 187 gr de 2 casos, entre 188 - 212 gr de 3 casos, entre 213 - 237 gr de 1 caso y 0 casos para 238 gr o más

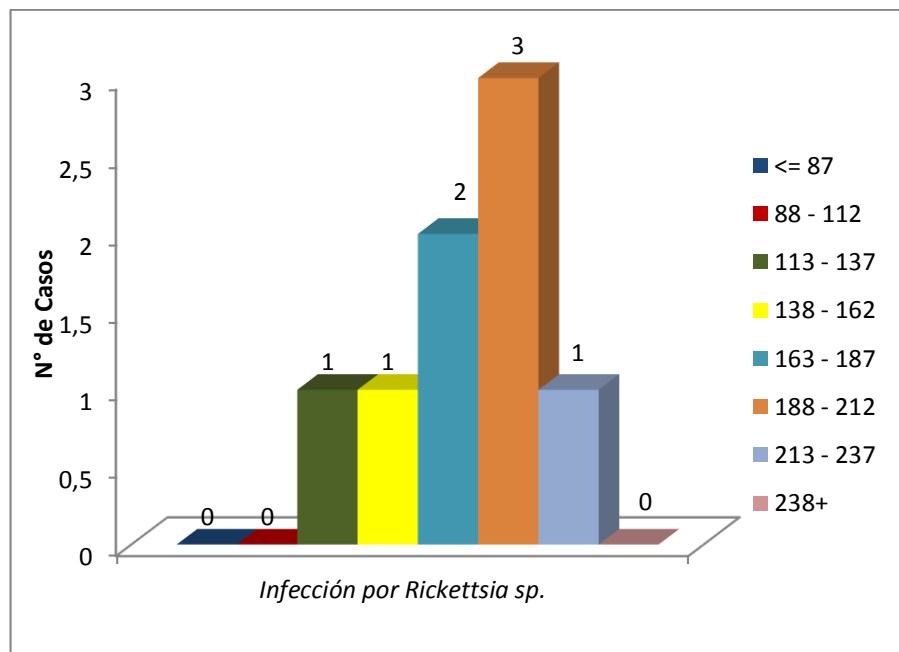


Figura 18: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y peso para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

En la Figura 19, se aprecia el número de casos expresado en porcentajes de infección determinada por IFI en relación al peso en las muestras con un porcentaje de 0 % para pesos de 87 gr o menos, 0% de casos para pesos entre 88 - 112 gr, entre 113 - 137 gr de 12,5% de casos, entre 138 - 162 gr de 12,5% de casos, entre 163 - 187 gr de 25% de casos, entre 188 - 212 gr de 37,5% de casos, entre 213 - 237 gr de 12,5 % de casos y 0% de casos para 238 gr o más.

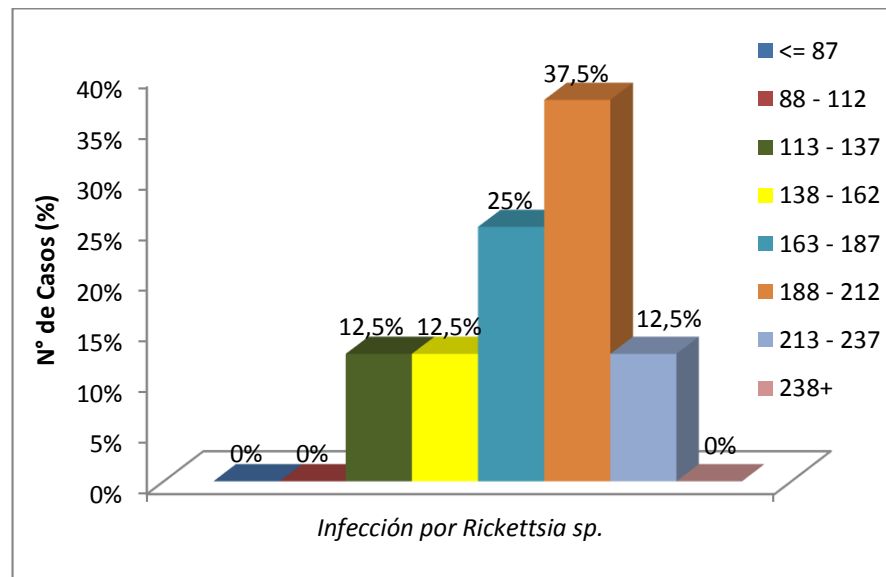


Figura 19: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y peso para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

4.3.6. Confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* y la variable longitud total

Tabla 09: Confrontación entre los casos de infección por *Rickettsia sp.*, determinada por IFI, y longitud total para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

Infección por <i>Rickettsia sp</i>	Longitud Total (cm)							Total
	<= 21,0	23,2 - 25,3	25,4 - 27,4	27,5 - 29,6	29,7 - 31,7	31,8 - 33,9	34,0+	
N° casos	0	1	3	2	2	0	0	8
N° casos (%)	0%	12,5%	37,5%	25,0%	25,0%	0%	0%	100%

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 20, se aprecia el número de casos de infección determinada por IFI en relación a la longitud total en las muestras con un recuento de 0 casos para longitud de 21 cm o menos, 1 caso para longitud entre 23,2 - 25,3 cm, entre 25,4 - 27,4 cm de 3 casos, entre 27,5 - 29,6 cm de 2 casos, entre 29,7 - 31,7 cm de 2 casos, entre 31,8 - 33,9 cm de 0 casos y 0 casos para 34 cm o más.

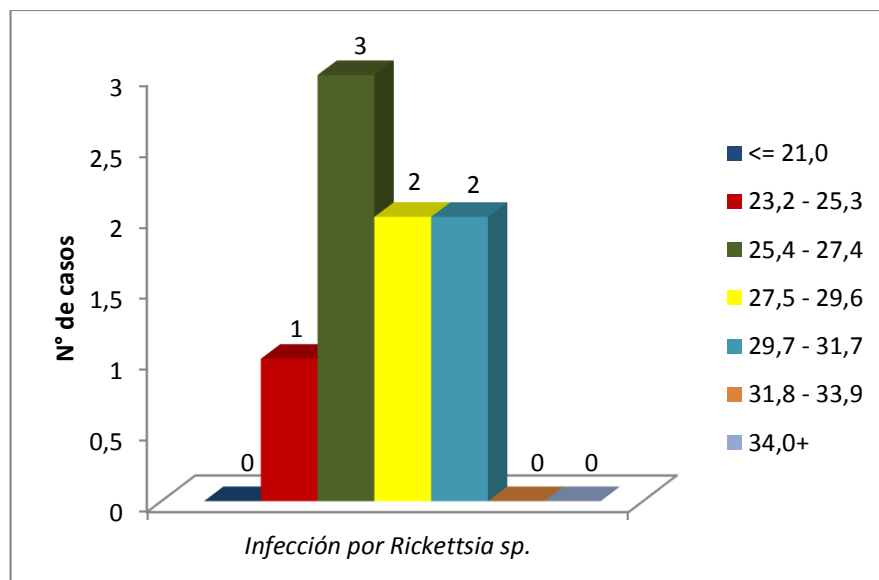


Figura 20: Gráfico de barras que representa los casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y longitud total para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

En la Figura 21, se aprecia el número de casos de infección determinado por IFI expresado en porcentajes en relación a la longitud total en las muestras con un porcentaje de 0% de casos para longitud de 21 cm o menos, 12,5% de casos para longitud entre 23,2 - 25,3 cm, entre 25,4 - 27,4 cm de 37,5% de casos, entre 27,5 - 29,6 cm de 37,5% de casos, entre 29,7 - 31,7 cm de 25% de casos, entre 31,8 - 33,9 cm de 0% de casos, 0% casos para 34 cm o más.

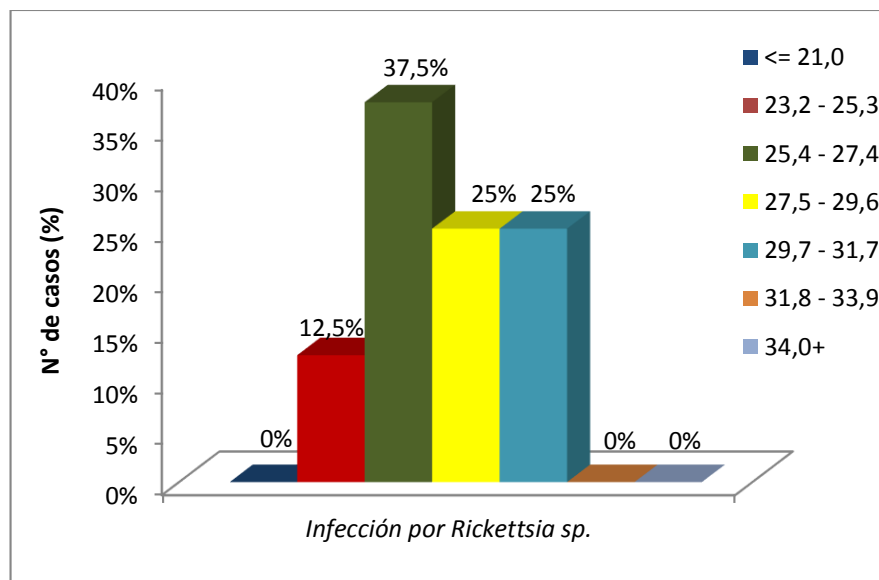


Figura 21: Gráfico de barras que representa los resultados en porcentajes de casos de la confrontación entre la infección por *Rickettsia sp.* determinada por IFI y longitud total para las muestras séricas de *Rattus norvegicus*.

V. DISCUSIÓN

Es importante destacar que el presente estudio señaló datos de investigaciones en el campo de la rickettsiología que en su mayoría son estudios realizados acerca del huésped accidental, en cuyo caso se han realizado en forma piramidal.

Las rickettsiosis constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución geográfica heterogénea cuya severidad varía desde formas benignas y autolimitadas a infecciones fulminantes de elevada mortalidad (Anda *et al*, 2007).

Adams *et al*, (1970); Zavala *et al*, (1996); Piza, (1932); Dias y Martins, (1939); Conti-Diaz *et al*, (1990); Ripoll *et al*, (1990); Quintero *et al*, (2012); reportaron casos de infección rickettsial en Estados Unidos, México, Brasil (São Paulo), Brasil (Minas Gerais), Uruguay, Argentina y Colombia respectivamente. Travassos, (1949); indicó que *Rickettsia typhi* fue aislado por primera vez en un paciente humano en São Paulo, Brasil.

Esto muestra la distribución marcada de esta infección en nuestro continente y corrobora lo expuesto por Anaya *et al*, (2012); cuando señaló que la incidencia y distribución geográfica de casos de fiebre manchada de

las Montañas Rocosas y Tifus murino, han variado impresionantemente desde el reconocimiento de la enfermedad a finales del siglo XIX.

Los factores esenciales que facilitan la distribución de la rickettsiosis son: el subdesarrollo económico, cultural e incremento de la suburbanización, donde se indica que el reservorio (*Rattus norvegicus*) suele habitar asentamientos humanos en condiciones de precariedad, descrito de la siguiente manera: vertederos municipales dispuestos de forma incorrecta infringiendo los estándares establecidos (Anaya *et al*, 2012).

Así también tapas de buzones del desagüe ausentes, falta de programas de zoonosis integrados y programas de desratización no adecuados que contravienen lo dispuesto por la Norma Sanitaria para los trabajos de Desinsectación, Desratización, Desinfección, Limpieza y Desinfección de reservorios de agua, Limpieza de ambientes y Limpieza de tanques Sépticos (Resolución Ministerial N° 449 - 2001 - SA – DM).

De acuerdo a Walter *et al*, (1999); desde 1989 en el Perú existen notificaciones sustanciales de casos de tifus epidémico distribuido en las regiones de Ancash, Arequipa, Cusco, Huánuco, Piura, y Puno; lo que nos permite afirmar que en nuestro país existe prevalencia de esta

enfermedad. Además Anaya *et al*, (2012); procesó sueros de diferentes localidades del Perú, para identificar la presencia de anticuerpos contra *Rickettsia sp.* y encontró evidencia serológica de rickettsiosis en los huéspedes accidental y reservorio provenientes de los departamentos de Tumbes, Piura, Junín, Ucayali, Arequipa, Puno, Cusco, Loreto, Madre de Dios y Tacna.

En la manifestación clínica de la aparición de la triada “dolor de cabeza, fiebre y erupción”, ésta no siempre es patognómica, sin embargo ante la sospecha por presentación de alguno de estos síntomas es necesario iniciar la intervención terapéutica, solo así se puede lograr una pronta y adecuada mejora del paciente (Walker y Dumler, 1997).

Las rickettsiosis están clasificadas en base a las proteínas de superficie inmunodominantes rOmpA y rOmpB, que permite la diferenciación de dos grupos; el grupo de las Fiebres Manchadas y el grupo Tifus (Zavala *et al*, 2004).

Para Walker y Dumler, (1997); el grupo tifus está clasificado por el Tifus exantémico epidémico por el agente *Rickettsia prowasekii* y el Tifus murino o endémico por el agente *Rickettsia typhi*, el primero posee una

distribución en América del sur y el Tifus murino o endémico una distribución mundial.

Con respecto a la epidemiología del Tifus murino la enfermedad es altamente prevalente en todo el mundo, especialmente en áreas cálidas y particularmente en puertos y regiones costeras infestadas con ratas y pulgas (Anaya *et al*, 2012).

En el caso de los animales la seroprevalencia evidenciada en la mayoría de los casos suelen ser más altas que en humanos, esto puede ser una herramienta a utilizar de acuerdo a los sistemas de vigilancia epidemiológica implementados en cada país (Zavala *et al*, 1996).

Rickettsia typhi existe en la naturaleza en ciclos enzoóticos que involucran roedores y ectoparásitos. Es transmitida a los humanos principalmente por *Xenopsylla cheopis* la pulga de la rata causando el Tifus murino (Nogueras *et al*, 2006).

Anaya y Morón, (2003); establecieron como prueba “gold estándar” para el diagnóstico laboratorial de rickettsiosis la Inmunofluorescencia indirecta; Afirmación que tiene precedentes en investigaciones por Adams

et al, (1970);Conti-Diaz *et al*, (1990) y Ripoll *et al*, (1990) en sus respectivas publicaciones.

De acuerdo a la descripción estadística que se obtuvo, evidenció que en la zona calificada como vertedero (puntos A, B y C) se realizó mayor cantidad de capturas, mostrando el punto C un porcentaje de 30,98% (22) descrito en la Tabla 01 y Figura 07, esto se debe probablemente a que *Rattus norvegicus* es un roedor comensal cuyo hábitat principal se encuentra en los medios urbanos y rurales, donde es frecuente encontrarlo en basureros, cloacas, alcantarillas y sótanos (Mills *et al*, 1998).

En la presente investigación los resultados de identificación de especies fueron (Tabla 02 y Figura 08): 91,55% (65) para *Rattus norvegicus* y 8,45% (6) para *Rattus rattus*, realizadas con las claves de identificación de Mills *et al*, (1998).

Para la determinación de infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* mediante IFI (Tabla 03 y Figura 09), el porcentaje de casos positivos fue de 12,31 % (8) y el porcentaje de casos negativos a infección fue 87,69% (57), resultados similares a los obtenidos por Quintero *et al*, (2012); que encontró por IFI una frecuencia positiva de 43 % y negativa en

el 57 % de 335 roedores que incluyeron *Rattus rattus* , *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*.

En lo referente a la primera confrontación de variables estudiadas, que correspondió a infección rickettsial por IFI frente a la procedencia del roedor (Tabla 04, Figura 10 y Figura 11), se observó que los resultados fueron altamente significativos tanto para procedencia peridomicilio con 37,5%(3) de 19 casos, como para procedencia vertedero 62,5%(5) de 46 casos. La diferencia porcentual marcada puede deberse a que la ubicación peridomicilio, adicionalmente a lo que ofrecen los vertederos se convierte en refugio de los roedores, siendo predilecto para la etapa de padecimiento o reposo por causa de alguna infección (Anaya, Morón, Arias, Chauca y Román, 2007).

En cuanto a la confrontación infección rickettsial por IFI frente a sexo (Tabla 05, Figura 12 y Figura 13), destacó el porcentaje de casos positivos en roedores hembra de 62,5% (5) mientras que en roedores machos un porcentaje de 37,5% (3), probablemente se debe a que las hembras tienen actividad de recolección de alimentos y las crías dependen de la madre para alimentarse hasta que tienen unas 3 semanas motivo por el cual suelen ser las más expuestas para ser capturadas (Mills *et al*, 1998), siendo preocupante porque dado el hecho que, el patógeno es mantenido

en la naturaleza, a través de varias generaciones, mediante el paso trans ovárico de una hembra infectada a su progenie (Walker y Dumler, 1997).

Se obtuvo infección rickettsial por IFI en adultos de 87,5% (7) mientras que en juveniles de 12,5% (1), (Tabla 06, Figura 14 y Figura 15), resultados que contrastan con lo obtenido por Quintero *et al*, (2012); que detectó por IFI anticuerpos antirickettsias en roedores adultos 80,96 % y en juveniles 19,04%, esto puede ser explicado por los hábitos en los roedores, los conflictos que se generan en los grupos donde los adultos predominan depredando a los juveniles y sumado a esto el periodo que los juveniles viven en madrigueras que les permite eludir capturas (Mills *et al*, 1998), resultando así un mayor porcentaje de adultos expuestos a captura, lo que no asegura que los juveniles no estén expuestos a la infección rickettsial.

En lo que concierne a la confrontación infección rickettsial por IFI frente a lesión del roedor (Tabla 07, Figura 16 y Figura 17), cabe destacar que la reacción serológica en lesión presente fue de 0% (0), frente a lesión ausente de 100% (8) resultados que, de acuerdo a lo señalado por Anaya *et al*, (2012); que manifestó que la presencia de lesión no es factor determinante para la transmisión de la rickettsiosis y que las lesiones son un hecho que acontece comúnmente en la población de roedores por

diversos motivos, presentando lesiones en su mayoría en orejas y cola. Esto nos conduce al planteamiento de Nogueras *et al*, (2006); que cita que el factor determinante para la ocurrencia de infección rickettsial se debe a la participación del vector en este caso *Xenopsylla cheopis* (pulga de la rata).

En cuanto a la confrontación de la infección rickettsial por IFI frente a peso (Tabla 08, Figura 18 y Figura 19), para los pesos 87 -112 gr y el intervalo de 238 gr o más, no se evidenció reacción serológica, donde sí se evidenció reacción serológica fue para los roedores comprendidos entre los pesos 113-137 gr de 12,5%(1), 138-162 gr de 12,5% (1), entre 163-187 gr de 25% (2), entre 188-212 gr de 37,5% (3) y entre 213-237 gr de 12,5 % (1). Donde se observó que los porcentajes de infección rickettsial se encuentra en el valor promedio de la variable peso, excluyendo los extremos con resultado negativo ante infección rickettsial. No se encontró bibliográficamente estudios que señalen este hecho con exactitud pero Zavala *et al*, (1996); mencionó en su investigación en humanos que la malnutrición es un factor para la ocurrencia de la infección, pero el mismo acota que existe un periodo de incubación que es de 3 a 12 días, motivo por el cual es que se pueda interpretar erróneamente que el peso no esté relacionado con la manifestación de esta enfermedad.

Al enfrentar las variables, infección rickettsial por IFI y longitud total (Tabla 09, Figura 20 y Figura 21), se detectó infección rickettsial entre los intervalos de longitudes de 23,2-25,3 cm de 12,5% (1), 25,4-27,4 cm de 37,5% (3), 27,5-29,6 cm de 25% (2), 29,7-31,7 cm de 25% (2), no se detectó infección rickettsial entre los intervalos de longitudes de 21 cm o menos, 31,8-33,9 cm y de 34 cm o más. Existe una relación entre la procedencia del roedor y la longitud según Anaya *et al*, (2007); afirma que roedores que habitan alcantarillas presentan mayor longitud en comparación a roedores que habitan zonas urbanas, pero ningún estudio advierte de una relación considerable entre longitud e infección rickettsial.

VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó que la infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* mediante IFI fue 12,31 %.
2. Se estableció que la relación entre la infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* con procedencia peridomicilio fue mayor que la de procedencia vertedero.
3. Se estableció que la relación entre la infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* hembras es mayor que en machos.
4. Se estableció que la frecuencia de infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* adultos es mayor que en juveniles.
5. Se determinó que la infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* frente a lesión ausente fue el 100 %.
6. Se estableció que la infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* relacionada a peso fue mayor en el intervalo 188 - 212 gr.

7. Se estableció que la infección por *Rickettsia sp.* en *Rattus norvegicus* relacionada a longitud total fue mayor en el intervalo 25,4 - 27,4 cm.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar trabajos de investigación acerca del huésped accidental y vector en los puntos referidos en este estudio.
2. Se recomienda realizar trabajos de investigación acerca de los factores riesgos en los pobladores.
3. Se sugiere realizar Inmunofluorescencia indirecta a los pobladores en los puntos donde se han capturado roedores positivos a infección rickettsial.
4. Se sugiere implementar equipos multisectoriales para llevar a cabo estudios de prevalencia.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Adams W., Emmons R. & Brooks J.** (1970). The changing ecology of murine (endemic) typhus in southern California. *Am. J Trop Med Hyg* 1970; (311-318).
2. **Anaya, E., Morón, C., Arias, P., Chauca, J. & Román, R.** (2007). Evaluación de pruebas de Elisa e Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra Rickettsiosis .*Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008; 25(3): 336-39.
3. **Anaya E. & Morón C.** (2003).Guía de diagnóstico clínico epidemiológico y laboratorial de Rickettsiosis. Laboratorio de Rickettsias del Instituto Nacional de Salud. 2003:3-19.
4. **Anaya E., Palacios, R., Pachas, P., Mendoza, L. & Mosquera, P.** (2012).Infecciones Rickettsiales transmitidas por garrapatas y pulgas en cuatro Poblaciones Fronterizas de Perú: Loreto, Madre de Dios, Tumbes y Tacna,2012. Centro de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.

5. **Anda P., Blanco J., Jado I., Marin M., Oteo J., Pons I., Portillo A.** (2007). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Madrid, España: Fundación Española.
6. **Bechah Y, Capo C, Mege JL & Raoult D.** (2008) Epidemic typhus. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8(7):417-26.
7. **Bermúdez, S., Lyons, C., García, G., Zaldívar, Y., Gabster, A., & Arteaga, G.** (2013). Serologic evidence of human *Rickettsia* infection found in three locations in Panamá. *Biomédica.* 2013; 33(Supl.1).
8. **Brouqui P. & Raoult D.** (2006). Arthropod-borne diseases in homeless. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1078:223-35.
9. **Cicuttin G., Rodríguez M., Jado I., & Anda, P.** (2004). Primera detección de *Rickettsia massiliae* en la Ciudad de Buenos Aires: resultados preliminares. *Rev Argent Zoonosis* 2004; 1: 8-10.

10. **Conti-Díaz I., Rubio I. & Somma M.** (1990). Lymphatic cutaneous rickettsiosis caused by *Rickettsia conorii* in Uruguay. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1990; 32: 313-318.
11. **Conti-Díaz I., Moraes J., Pacheco R., & Labruna, M.** (2009). Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2009; 51(6): 337-9.
12. **Crocquet P., Díaz-Montero C., Feng H., Li H., Barrett A., Walker D.** (2001). Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis. Vaccine 2001; 20(5-6): 979-88.
13. **Dias E. & Martins A.** (1939). Spotted fever in Brazil. A summary. Am J Trop Med Hyg 1939; 19: 103-108.
14. **Díaz J., & Cataño J.** (2010). Fiebre manchada de las montañas rocosas: ni tan manchada ni tan montañosa como pensábamos. Infection 2010; 14(4): 264-76.

15. **Heinzen R.** (2003). Rickettsial actin-based motility: behavior and involvement of cytoskeletal regulators. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990: 535-47.
16. **Hernández M, Angel-Moreno A, Santana E.** (2004). Murine typhus with renal involvement in Canary islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:740-743.
17. **Kaplan J. & Schonberger L.** (1986). The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35(4): 840-4.
18. **Labruna M.** (2009). Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1166: 156-66.
19. **Labruna M., Mattar V., Nava S., Bermúdez S., Venzal J., & Dolz G.** (2011). Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Revista MVZ. Córdoba, España* 16(2):2435-2457.
20. **Matsumoto K., Ogawa M., Brouqui P., Raoult D., & Parola P.** (2005). Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Med Vet Entomol* 2005; 19(3): 263-70.

21. **Meehan, A.** (1984). Rats and mice: Their biology and control. East Grinstead, England: Rentokil Ltd.
22. **Mills J., Childs J., Ksiazek T. & Peters C.** (1998). Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. Atlanta: CDC; 1998).
23. **Nava S., Elshenawy Y., Eremeeva M., Sumner J., Mastropaolo M., & Paddock C.** (2008). Rickettsia parkeri in Argentina. Emerg Infect Dis 2008; 14(12): 1894-7.
24. **Nogueras M., Cardeñosa N., Sanfeliu I., Muñoz T., Font B. & Segura F.** (2006). Evidence of infection in humans with Rickettsia typhi and Rickettsia felis in Catalonia in the Northeast of Spain. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1078:159-61.
25. **Olano J, Ramírez G, Moscoso B, Watts D & Walker D.** (1998). Epidemic typhus outbreaks in Cuzco, Perú. Program and abstracts of the 47 th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene 1998; 59: 282.

26. **Pachas P., Jaramillo K. & Hoyos A.** (1999).Brote de tifus murino en la provincia de Huari. En: VI Congreso de Enfermedades Infecciosas y Tropicales 1999; Lima, Peru.
27. **Pachas P., Moron C. & Hoyos A.** (2001).*Rickettsia felis* identified in *Ctenocephalides canis* fleas from Peruvian Andes. En:ASR Bartonella Joint Conference; 2001; Montana, USA.
28. **Pacheco R., Venzal J., Richtzenhain L., & Labruna M.** (2006). *Rickettsia parkeri* in Uruguay.Emerg Infect Dis 2006; 12(11): 1804-5.
29. **Paddock C., Fernández S., Echenique G., Sumner J., Reeves W. & Zaki S.** (2008).Rocky Mountain spotted fever in Argentina. Am J Trop Med Hyg 2008; 78(4): 687-92.
30. **Paddock C., Sumner J., Comer J., & Zaki S.** (2004).*Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clin Infec Dis 2004; 38(6): 805-11.
31. **Parker R., Kohls G., Cox G., & Davis G.** (1939). Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. Public Health Rep 1939; 54: 1482-4.

32. **Parker R.** (1940). A pathogenic rickettsia from the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. Proc Third Int Congress Microbiol New York; 1940: 390-1.
33. **Parola P., Paddock C. & Raoult D.** (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev 2005; 18:719-56.
34. **Parola P, Labruna M., & Raoult D.** (2009). Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. Curr Infect Dis Rep 2009; 11(1): 40-50.
35. **Piza J.** (1932). Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. São Paulo: Sociedade Impressora Paulista 1932; Pp.11-119.
36. **Quintero J., Londoño A., Díaz F., Agudelo P., Arboleda M. & Rodas J.** (2012). Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia. Colombia, Instituto de salud pública: Antioquia, Colombia: 2012; (33).

37. **Resolución Ministerial Nº 449 - 2001 - SA - DM** (Norma Sanitaria para los trabajos de Desinsectación, Desratización, Desinfección, Limpieza y Desinfección de reservorios de agua, Limpieza de ambientes y Limpieza de tanques Sépticos).
38. **Ripoll C., Remondegui C., & Ordonez G.** (1999). Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 350-354.
39. **Seijo A., Picollo M., Nicholson W., & Paddock C.** (2007). Fiebre manchada por rickettsias en el Delta del Paraná: una enfermedad emergente. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67(6): 723-6.
40. **Sierra de Baza.** «Rata común o de alcantarilla (*Rattus norvegicus*). Consultado el 15 de diciembre del 2014. Disponible en: www.wikipedia.com/sierradebazarattus/html.
41. **Silveira I., Pacheco R., Szabó M., Ramos H., & Labruna M.** (2007). *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(7): 1111-3.

42. **Sumner J., Durden L., Goddard J., Stromdahl E., Clark K. & Reeves W.** (2007). Gulf coast ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(5): 751-3.
43. **Supo, J.** (2012). Estadística para la investigación científica y análisis de datos. N°2014-00205, ISBN: 1493718657, ISBN-13: 978-1493718658. Arequipa, Perú.
44. **Travassos J., Rodrigues P. & Carrijo L.** (1949). Tifo murino em São Paulo. Identificação da rickettsia mooseri isolada de um caso humano. *Mem Inst Butantã* 1949; 21: 77-106.
45. **Valbuena G.** (2007). Fiebres que no deberían matar. *Biomedica* 2007; 27(3): 321-4.
46. **Vitale G., Mansuelo S., Rolain J., & Raoult D.** (2006). *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(1): 174-5.
47. **Walker D. & Dumler J.** (1997). Rickettsial infections. En: Connor DH, Chandler FW, eds. *Pathology of Infectious Diseases Vol 1*. Stanford, Connecticut: Appleton & Lange 1997: 789-99.

48. **Walter O., Zavala-Velazquez J., Ramirez G.** (1999).Emerging infectious diseases in the Americas. En: Raoult D,Brouqui D, eds.Rickettsia and rickettsial diseases at the turn of the third millennium. Paris: Elsevier; 1999. Pp. 274-277.
49. **Zavala C., Ruiz A. & Zavala V.** (2004). Las Rickettsias del grupo de las fiebres manchadas: Respuesta inmune y sus proteínas inmunodominantes. Revista Médica de Chile. 2004; 132(3): 381-387.
50. **Zavala J., Xue Y. & Walker D.** (1996). Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. American Journal of Tropical Medical and Hygiene. 55: 157-159.

IX. ANEXOS

ANEXO 01

Lista de verificación de Materiales

ARTÍCULO	CANTIDAD	ARTÍCULO	CANTIDAD
PREPARACION INICIAL		Mechero de alcohol	1
Trampas Sherman	300	Etanol al 100%	0.5 L
Trampas Tamahawk	60	Botella a presión (pizeta)	1
Cintas deslindadoras	3 rollos	Etanol o alcohol isopropílico al 70%	
		Formulario para registro de tramas	
Bolitas de algodón (en tiempo frío)		Formulario para evaluar el hábitat	
Bolso o mochila para trampas		Tablilla para sostener papeles	
		Nitrógeno líquido o hielo seco y heladera	1
RECOLECCION/PROCESAMIENTO		Jeringas de 1 cc con aguja	
Bolsas plásticas para recolección		Agujas de 22g: 3.75 cm	
Guantes de goma gruesa			
Cinta blanca para rotular		Pinza larga (30 cm)	
Lápices y sacapuntas			
Respiradores/anteojos o PAPP		Lapicera de tinta indeleble	
Guantes de látex descartables		Recipiente de 4L de boca ancha	
		Cajas de congelador para muestras	
Sillas o banquetas			
Bolsas de cierre hermético (30 cm x 30 cm)	25	Cepillo mango largo (para trampas)	
		Cepillo de cerda (para instrumental)	
		Recipientes grandes (para agua)	
		Jabón para las manos	
		Bolsas grandes para basura	
		Bolsas de bioseguridad	
		Cinta de autoclave	
Cuadros de gasa		Equipo de primeros auxilios	
Balanza Pesola 100g y 1000 g			
		Repelente de insectos	
Recipiente de pared gruesa para instrumentos cortantes o punzantes		Bolsas de cierre hermético (20 x 20 cm)	
Tijera de disección		Guía de mamíferos	
Bandeja para Lysol/Instrumental			

ANEXO 03

Preparación de Buffer y soluciones para IFI

1. BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) pH 7,2 0,01M

- Na_2HPO_4 1,42 g
- NaH_2PO_4 1,20 g
- NaCl 8,2 g
- Agua destilada c.s.p. 1000,00 mL

2. BUFFER FOSFATO DILUYENTE (PBS+Tween 80 al 1%)

- PBS 99,0 mL
- Tween 80 1,0 mL

3. SOLUCIÓN DE AZUL DE EVANS (SOLUCION STOCK)

- Azul de Evans 10,0 mg
- PBS + Tween 80 100,0 mL
- Conservar en refrigeración a 4°C
- Preparar la solución de trabajo antes de usarla
- Solución stock 1,0 parte
- PBS Tween 80 9,0 partes

4. BUFFER CARBONATO – BICARBONATO 0,5M pH 9,5

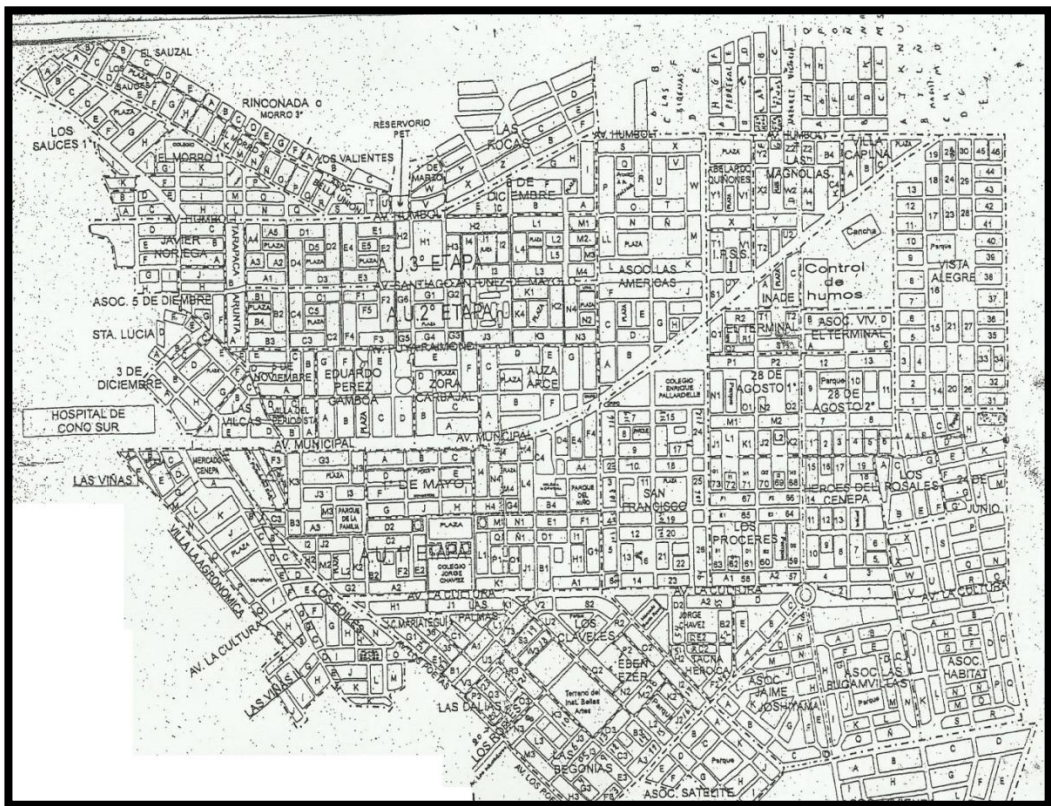
- Solución A
- Na_2HCO_3 Anhidro 5,3 g
- Agua destilada cs.p. 100,0 mL
- Solución B
- NaHCO_3 Anhidro 4,2 g
- Agua destilada cs.p 100,0 mL
- Agregar la Solución A sobre la solución B, hasta pH 9,5

5. GLICERINA TAMPONADA

- Glicerina bidestilada 9,0 mL
- Buffer Carbonato-Bicarbonato 0,5M, pH 9,5 1,0 mL

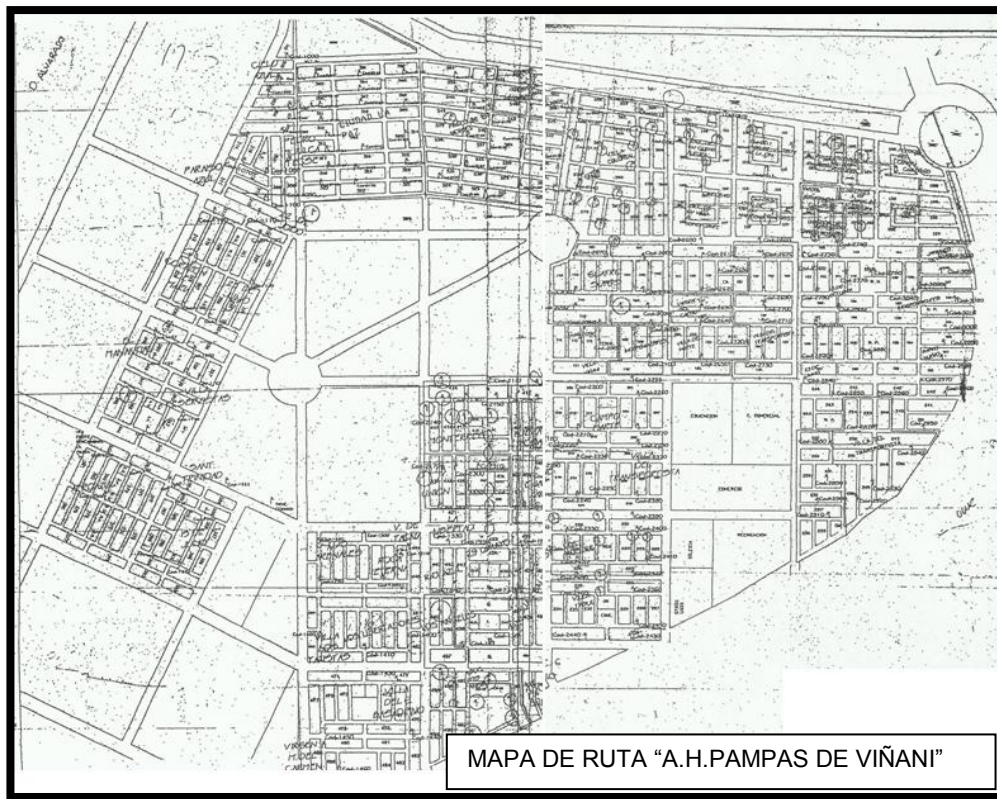
ANEXO 04

“Ubicación del Distrito coronel Gregorio Albarracín”



ANEXO 05

“Ubicación del sector Pampas de Viñani”



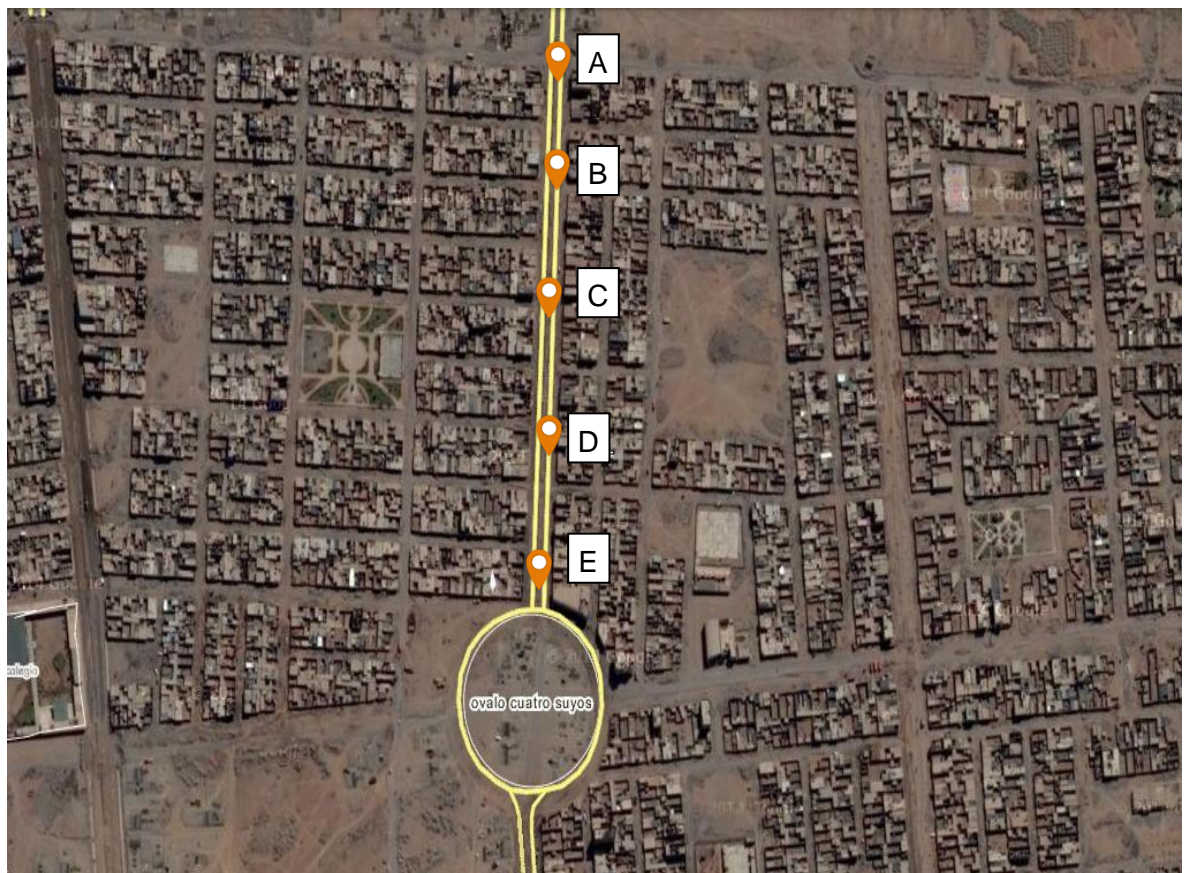
ANEXO 06

Mapa de vista del sistema de posicion global (GPS) de los puntos de muestreo



ANEXO 07

Ubicación de los puntos de muestreo por el Sistema de posición Global (GPS); A ($S18^{\circ}03'34.5''$ $W070^{\circ} 15'06.3''$ elevación 471m) ,B ($S18^{\circ}03'41.0''W070^{\circ} 15'07.0''$ elevación 472m) , C ($S18^{\circ}03'42.0'' W070^{\circ} 15'08.5''$ elevación 472m) ,D ($S18^{\circ}03'44.3'' W070^{\circ} 15'10.4''$ elevación 471m) y E ($S18^{\circ}04'31.5'' W070^{\circ} 25'14.5''$ elevación 470m).



ANEXO 08

Cronograma de salidas de campo

ACTIVIDAD/ NOCHE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Muestreo punto A	X	X	X	X	X																				
Muestreo punto B						X	X	X	X	X	X														
Muestreo punto C												X	X	X	X										
Muestreo punto D															X	X	X	X							
Muestreo punto E																				X	X	X	X	X	

ANEXO 09

Fotografías de muestreo y captura de *Rattus norvegicus* en los puntos A (S18°03'34.5'' W070° 15'06.3'' elevación 471 m) ,B (S18°03'41.0''W070° 15'07.0'' elevación 472 m) , C (S18°03'42.0'' W070° 15'08.5'' elevación 472 m) ,D (S18°03'44.3'' W070° 15'10.4'' elevación 471 m) y E (S18°04'31.5'' W070° 25'14.5'' elevación 470 m): (1), (2) , (3), y (4) selección del área de muestreo.



ANEXO 10

Fotografías de muestreo y captura de *Rattus norvegicus* en los puntos A (S18°03'34.5'' W070° 15'06.3'' elevación 471 m) ,B (S18°03'41.0''W070° 15'07.0'' elevación 472 m) , C (S18°03'42.0'' W070° 15'08.5'' elevación 472 m) ,D (S18°03'44.3'' W070° 15'10.4'' elevación 471 m) y E (S18°04'31.5'' W070° 25'14.5'' elevación 470 m): (1), (2) , (3), (4) y (5) colocación de trampas Tomahawk®.



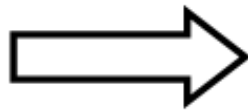
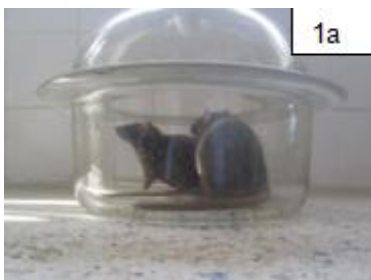
ANEXO 11

Fotografías de muestreo y captura de *Rattus norvegicus* en los puntos A (S18°03'34.5'' W070° 15'06.3'' elevación 471 m) ,B (S18°03'41.0''W070° 15'07.0'' elevación 472 m) , C (S18°03'42.0'' W070° 15'08.5'' elevación 472 m) ,D (S18°03'44.3'' W070° 15'10.4'' elevación 471 m) y E (S18°04'31.5'' W070° 25'14.5'' elevación 470 m): (1), (2) , (3), (4) y (5) recolección y traslado de trampas activadas.



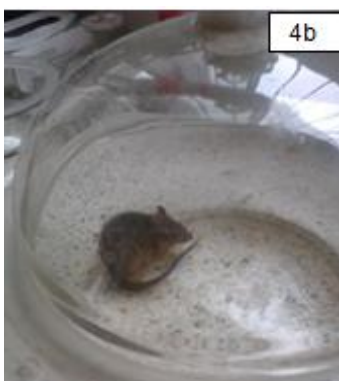
ANEXO 12

Fotografías de procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1a) colocación de roedores ;(1b) campana con cloroformo;(2) anestesia en campana de vidrio; (3a) Ketamina 10%;(3b) dosificación y (3c) administración intramuscular.



ANEXO 13

Fotografías de procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1) Pesaje (balanza electrónica) ;(2) longitud; (3) sexuado (identificación de sexo) ;(4a) fenología (adulto); (4b) fenología (juvenil) y (5) determinación de lesión.



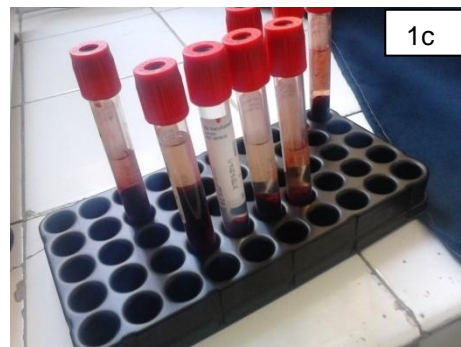
ANEXO 14

Fotografías de procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1) Fijación y punción cardiaca;(2) extracción de sangre y (3a) trasvase a tubos de suero;(3b) rotulación de tubo y (3c) tubos rotulados en gradilla.



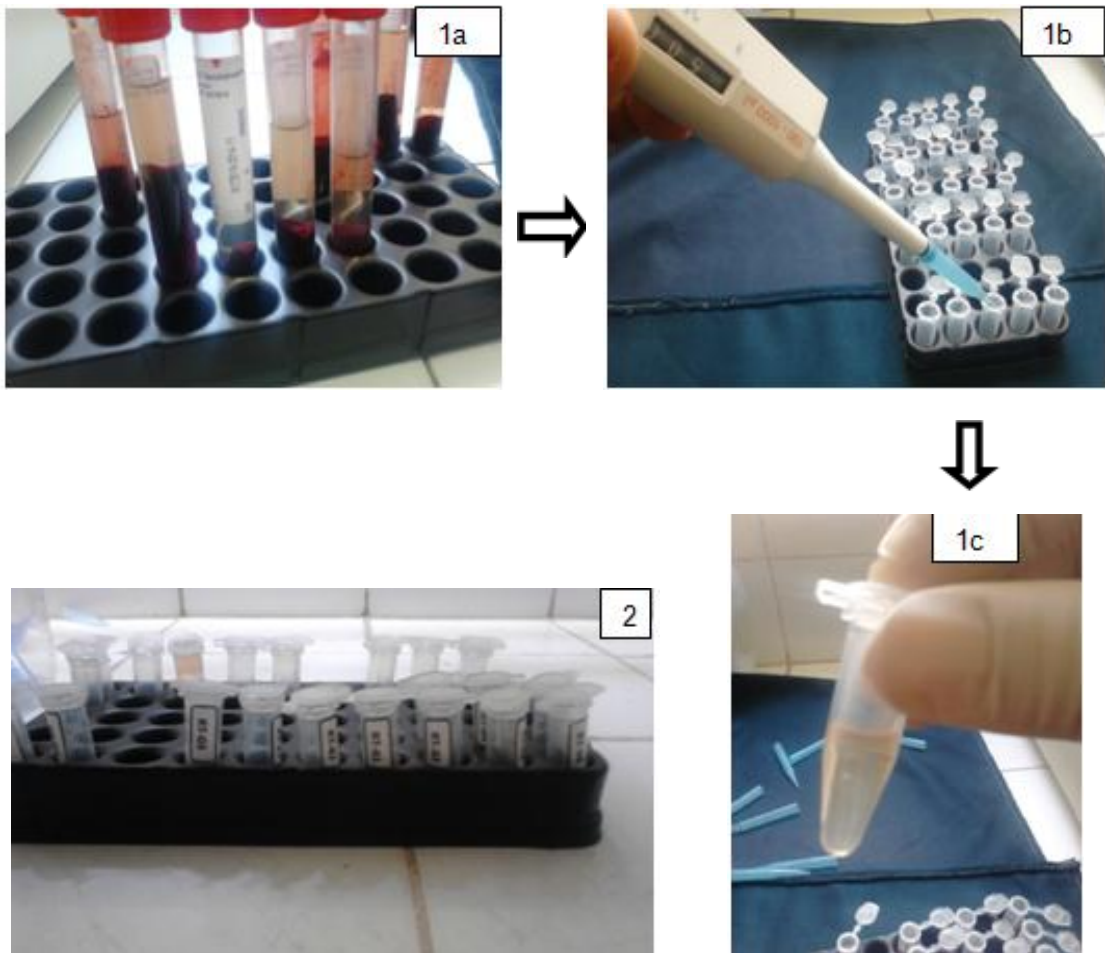
ANEXO 15

Fotografías de procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1a) centrifuga ;(1b) centrifugación; (1c) post centrifugación y (2) fase forme y suero.



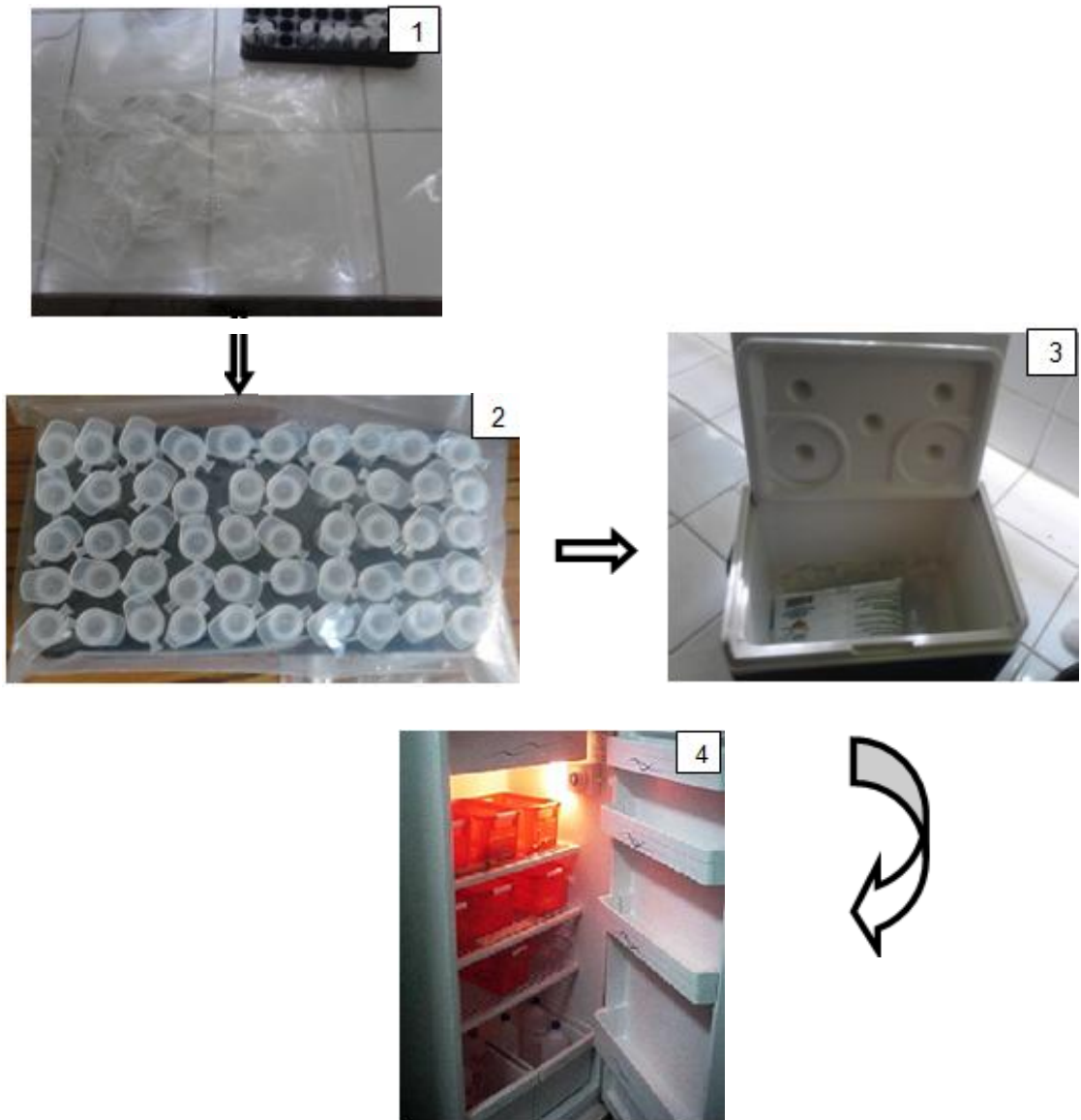
ANEXO 16

Fotografías de procesamiento laboratorial de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1a) tubos con fase forme y suero; (1b) separación de suero ;(1c) suero en criovial y (2) crioviales en gradilla.



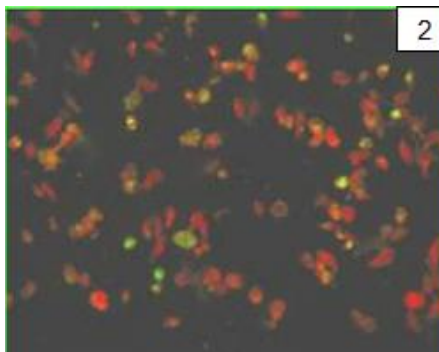
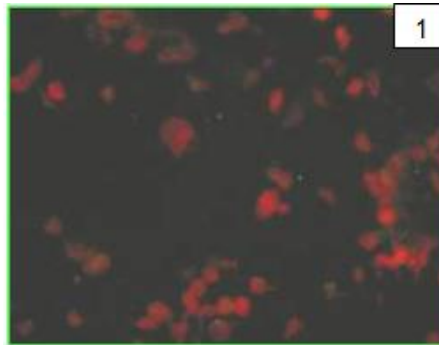
ANEXO 17

Fotografías de procesamiento laboratorial para envío de muestras séricas de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1) Selección de crioviales; (2) sellado hermético de crioviales ;(3) cooler con gel pack para traslado l y (4) ICE LINE (cadena de frio -20°C).



ANEXO 18

Fotografías de resultados de la Inmunofluorescencia indirecta de rickettsiosis en muestras séricas de *Rattus norvegicus* concerniente al protocolo de: (1) Microfotografía de epifluorescencia de resultados negativos por IFI no se observa corpúsculos fluorescentes intracitoplasmáticos (objetivo 40X) ;(2) microfotografía de epifluorescencia de resultados positivos por IFI, se observa corpúsculos fluorescentes intracitoplasmáticos (objetivo 40X).



ANEXO 19

Criterios en la interpretación de resultados

	Muestra desuero	IFI IgG	IFI IgT	Interpretación
SUEROS PAREADOS	Suero I	Negativo	Negativo	Caso Negativo
	Suero I	Negativo	Negativo	Infección reciente. En sueros pareados debe haber entre la primera y segunda muestra un incremento al triple o cuádruple del título de anticuerpos
	Suero II	Positivo	Positivo	
	Suero I	Positivo	Positivo	Infección reciente si se observa títulos $\geq 1/256$
	Suero II	Positivo	Positivo	
	Suero I	Positivo	Positivo	Infección pasada si se observa títulos $\leq 1/128$
Suero II	Positivo	Positivo		
SUERO ÚNICO	(Fase aguda)	Negativo ó Positivo con título $\leq 1/128$	Negativo ó Positivo con título $\leq 1/128$	Negativo ó Positivo $\leq 1/128$ Solicitar segunda muestra para
	(Fase aguda)	Positivo	Positivo	Infección reciente si se observa títulos $\geq 1/256$
	(Fase convalesciente)	Negativo	Negativo	Caso Negativo
	(Fase convaleciente)	Positivo	Positivo	Infección reciente si se observa títulos $\geq 1/256$
		Positivo	Positivo	Infección pasada si se observa títulos $\leq 1/128$

ANEXO 20

Producción de láminas IFI

A. Material de referencia

A.1. Producción de láminas

Panel de sueros control interno para probar lotes de láminas:

- Suero control positivo intermedio
- Suero control positivo fuerte
- Suero control negativo
- Solución tampón fosfato (PBS 1M pH. 7.2 +/- 0.2)

A.2. Diagnostico por Inmunofluorescencia Indirecta

- **Antígeno**

Cultivo de cepa de *R.akari*

B. Instrucción para el manejo y mantenimiento del material de referencia

B.1. Cepa referencial *Rickettsia akari*

Cultivo de Cepa referencial *R. akari*, en línea celular VERO ATCC con las características descritas anteriormente, con efecto citopático mayor o igual de 80%

Mantenimiento del cultivo es en solución tampón sucrosa fosfato glutamato (SPG) a -70°C.

Impregnadas en una concentración de 10^6 células/mL, fijadas en acetona y guardadas a -20°C .

El 10% del lote de láminas producidas se verificara si presenta reacción ante el panel de control interno:

- Suero control positivo intermedio
- Suero control positivo fuerte
- Suero control negativo
- Solución tampón (PBS 1M pH 7.2 +/- 0.2)

B.2. Sueros control positivo fuerte con título 1/256

Pool de sueros positivos por IFI con títulos mayor o igual a 1/256, se alícuota en volúmenes de 10uL y se guarda a -20°C .

B.3. Sueros control positivo intermedio con título 1/128

Pool de sueros positivos por IFI con títulos mayor o igual a 1/128, se alícuota en volúmenes de 10uL y se guarda a -20°C .

B.4. Suero control negativo

Pool de sueros negativos por IFI y aislamiento en un título de 1/64 se alícuota en volúmenes de 10uL y se guarda a -20°C .

B.5. Solución tampón fosfato 1M pH 7.2 +/- 0.2

Preparado el mismo día del uso

ANEXO 21

Criterio de control: Aceptación y rechazo

Material de referencia	Resultado aceptados	Resultados rechazado
Suero control positivo intermedio:	positivo en un título de 1/128 (++)*	títulos menores a 1/128
Suero control positivo fuerte:	positivo en un título de 1/256 (+++)*	títulos menores a 1/256
Suero control negativo:	negativo sin presencia de fluorescencia	cualquier resultado diferente
Solución tampón fosfato (PBS 1M pH 7.2 +/- 0.2):	negativo sin presencia de fluorescencia	cualquier resultado diferente

X. GLOSARIO

1. Biopsia: Es el procedimiento a través del cual se extrae una pequeña muestra biológica del cuerpo.
2. Escara: Es un tejido muerto que se desprende de la piel sana.
3. Exantema: Es una erupción cutánea que aparece de forma aguda, aparece frecuentemente con enfermedades infecciosas.
4. Pápula: Es una mancha elevada y sólida sobre la piel que mide hasta medio centímetro de ancho.
5. Rickettsemia: Es la presencia de rickettsias en la sangre.



Joel Henry Calle Tintaya

Tesista



Dr. César Julio Cáceda Quiroz

Asesor