

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

136
207

AISLAMIENTO DE RICKETTSIAS A PARTIR DE
SUS VECTORES; VECTOR Pediculus humanus, var.
corporis y capitis

TRAILLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
RAUL ALEJANDRO OLVERA QUEZADA

Directora de Tesis
Q.B.P. Judith Martínez Zamitz

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

SECCION	NO. DE PAGINA
- OBJETIVOS.....	1
- INTRODUCCION.....	2
- GENERALIDADES.....	10
- MATERIAL Y METODOS.....	66
- RESULTADOS.....	86
- DISCUSION.....	106
- CONCLUSIONES.....	109
- BIBLIOGRAFIA.....	111

OBJETIVOS

- 1) Llevar a cabo el aislamiento de microorganismos idénticos a Rickettsia quintana a partir de Pediculus humanus var. corporis y capitis.
- 2) Identificar los microorganismos aislados por medio de las Técnicas de Giménez y Machiavello, así como por la Técnica de - Microinmunofluorescencia Indirecta.
- 3) Determinar la posibilidad de infección de los microorganismos aislados en cobayos machos adultos, y ver las posibles alteraciones en diferentes órganos.
- 4) Probar un Medio Líquido, recomendado para los subcultivos de Rickettsia quintana, con los microorganismos aislados.
- 5) Determinar el Efecto Citopático de los microorganismos aislados en diferentes líneas celulares (HEP-2, TOXO, AAL) a diferentes diluciones.
- 6) Realizar una comparación en cuanto a condiciones de crecimiento y en la Técnica de Microinmunofluorescencia entre los microorganismos aislados y otras bacterias.

I N T R O D U C C I O N

Importancia del Tifo en México.

Las Rickettsiosis constituyen un grupo de enfermedades altamente contagiosas, producidas por bacterias de la familia Rickettsiaceae, transmitidas al hombre por la picadura de artrópodos infectados. La expresión clínica de la enfermedad es variable, las rickettsias tienden a permanecer en estado latente y los convalescientes quedan en estado de premunición. Hasta 1940, el Tifo fue la enfermedad transmisible que produjo más muertes después del Paludismo; y en la actualidad disponemos de recursos para limitar su transmisión, para inmunizar a los susceptibles y para modificar favorablemente el curso de la infección y de la enfermedad.

Las rickettsias son bacterias pequeñas que viven como parásitos naturales de ciertos artrópodos. Algunos de estos artrópodos pueden transmitir rickettsias a los animales y también al hombre. Casi todos nuestros conocimientos de las rickettsias provienen de estudios de las pocas especies que son patógenas para el hombre. Las rickettsias son diferentes de otras bacterias por su tamaño - pequeño, su transmisión por artrópodos y parasitismo intracelular obligado (16,25).

Las rickettsias son generalmente transmitidas al hombre por vectores (artrópodos). En el piojo y pulga, las rickettsias no infectan sus glándulas salivales, pero se multiplican en las células de la pared intestinal y se excretan en las heces en grandes cantidades, contaminando el área de la piel, cercana a la picadura. Las rickettsias penetran al cuerpo a través de picaduras u otras lesiones en la piel, o aerosoles que pueden inhalarse o pueden infectar la mucosa conjuntival (17).

En México, hasta hace poco, el Tifo ocurría en la Altiplanicie, especialmente en los barrios humildes de las grandes ciudades y después se limitó a las partes frías de las montañas; ahora existe en reductos tifógenos localizados en alturas mayores a los

1500 metros, mal comunicados, pobres, de población desnutrida y -
baja cultura. El agente infeccioso se mantiene en esas áreas, grn
cias a una alta parasitación por piojos de la ropa; como sucede -
en las zonas indígenas de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, México, Que-
rétaro, Hidalgo, Veracruz y Michoacán. (28).

Las enfermedades rickettsiales aparecen en todas las ciuda--
des aunque su prevalencia y significancia clínica varía. Pueden -
ser esporádicas o epidémicas, dependiendo de factores ecológicos
o epidemiológicos. Ya que las rickettsias han sido perfectamente
establecidas en su habitat natural; el médico debe permanecer ---
alerta en el reconocimiento de este desorden para aplicar el apro-
piado tratamiento y control efectivo (64).

Existen dos formas de transmisión para el Tifo Exantemático:

- 1.- forma Endémica, lenta, semiurbana o rural; por medio de la --
pulga, de rata a rata, o de rata a hombre.
- 2.- forma Epidémica, rápida, urbana o de aglomeraciones humanas;
cuando la rickettsia pasa por el piojo, también insecto domés-
tico, de hombre a hombre.

Uno de los hechos que llamó más la atención, era que en las
costas de clima caliente de nuestro país, casi no había Tifo, ---
mientras que en la altiplanicie se desarrollaban las grandes epi-
demias, cosa que se explica por la biología del piojo, que no vive
satisfactoriamente en los climas cálidos. De este modo la enfermg
dad paso de ser un padecimiento en que solo intervenía el hombre,
a ser una zoonosis (120).

En la actualidad el anhelo máximo de las autoridades de sa--
lud pública, es la eliminación de las enfermedades transmisibles
que aún diezman la población; a pesar de los adelantos técnicos y
científicos universalmente disponibles.

Ya se inició la consumación de este anhelo, cuando considera-
mos erradicada la Viruela; cuando recientemente se han incrementa

do los trabajos tendientes a la erradicación del Mal del Pinto y Oncocercosis. El Tifo Epidémico puede ser erradicado, y esta, debe ser una idea obsesiva de nuestras autoridades, porque concurren para lograrla todos los elementos necesarios que permiten eliminar a nuestro país de la lista de las naciones que aún tienen Tifo.

México presentó en tiempos pasados altos Coeficientes de Morbilidad y Mortalidad por Tifo, y con frecuencia fué azotado por brotes epidémicos muy serios, en los que la Mortalidad fué considerable. En la Tabla I puedan observarse los Coeficientes de Morbilidad y Mortalidad por cada 100,000 habitantes, que comprenden los períodos anuales de 1939 a 1979.

Sin duda, estamos llegando al momento en que se debe considerar esta enfermedad como un problema de proporciones reducidas y en vías de desaparecer; sin embargo, prevalece en zonas rurales, históricamente tifógenas, de los estados centrales, en donde aún subsisten condiciones favorables para el mantenimiento de la enfermedad.

En la Gráfica No. 1, se observa que la República Mexicana -- presenta, entre 1939 y 1979, una tendencia descendente en su Morbilidad. La última cifra de que se dispone es la correspondiente a 1979 con un coeficiente de 0.01.

La Mortalidad en la Gráfica No. 2, igualmente presenta tendencia descendente, la última cifra de que se dispone es la correspondiente a 1979 con 17 defunciones y un coeficiente específico de 0.05.

El Tifo ha quedado limitado a zonas relativamente aisladas -- de ciertos estados, en la actualidad con malas condiciones socio-económicas. La incidencia de casos se eleva durante los meses de Noviembre a Marzo, hecho importante para normar el desarrollo de programas de prevención.

T A B L A N O . I

MORTALIDAD Y MORBILIDAD POR TIFO
Y OTRAS RICKETTSIAS EN MEXICO
1939 - 1979.

MORTALIDAD POR
TIFO Y OTRAS
RICKETTSIAS EN MEXICO
1939 - 1979.

MORBILIDAD POR
TIFO Y OTRAS
RICKETTSIAS EN MEXICO
1939 - 1979.

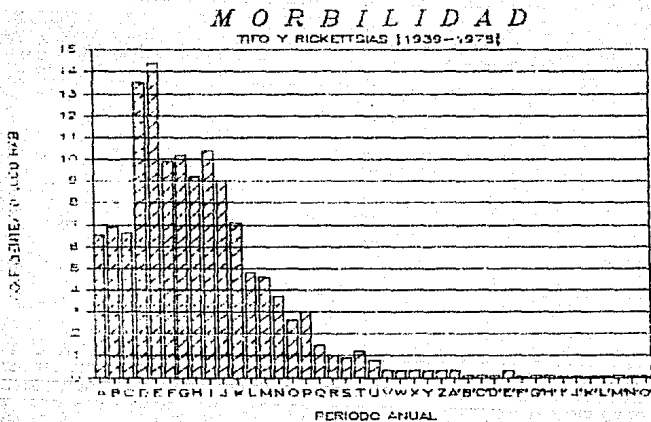
P. ANUAL COEFICIENTE

A	1939	5.9
E	1940	5.7
C	1941	5.6
D	1942	7.7
E	1943	7.3
F	1944	7.2
G	1945	6.5
H	1946	6.1
I	1947	6.2
J	1948	5.4
K	1949	3.3
L	1950	2.8
M	1951	2.8
N	1952	2.5
O	1953	2.2
P	1954	1.3
Q	1955	1.1
R	1956	0.9
S	1957	0.7
T	1958	0.6
U	1959	0.5
V	1960	0.5
W	1961	0.5
Y	1962	0.5
Y	1963	0.5
Z	1964	0.5
A'	1965	0.5
E'	1966	0.5
C'	1967	0.05
D'	1968	0.05
E'	1969	0.05
F'	1970	0.05
G'	1971	0.05
H'	1972	0.05
I'	1973	0.05
J'	1974	0.05
K'	1975	0.05
L'	1976	0.05
M'	1977	0.05
N'	1978	0.05
O'	1979	0.05

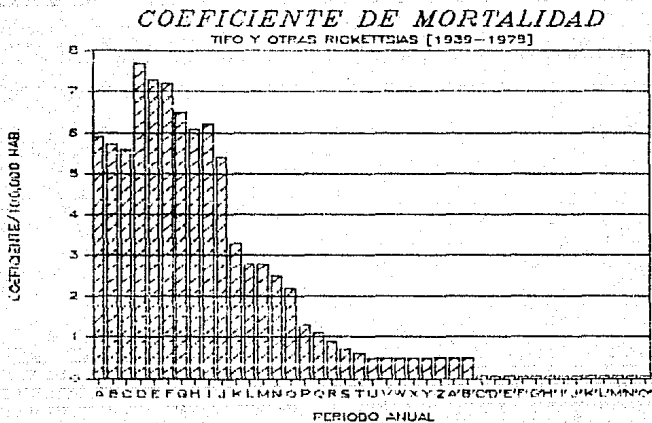
P. ANUAL COEFICIENTE

A	1939	6.5
B	1940	6.9
C	1941	6.6
D	1942	13.5
E	1943	14.4
F	1944	9.9
G	1945	10.2
H	1946	9.2
I	1947	10.4
J	1948	9.0
K	1949	7.1
L	1950	4.8
M	1951	4.6
N	1952	3.7
O	1953	2.6
P	1954	3.0
Q	1955	1.5
R	1956	1.0
S	1957	0.9
T	1958	1.2
U	1959	0.8
V	1960	0.3
W	1961	0.3
X	1962	0.3
Y	1963	0.3
Z	1964	0.3
A'	1965	0.3
E'	1966	0.1
C'	1967	0.1
D'	1968	0.1
E'	1969	0.3
F'	1970	0.05
G'	1971	0.1
H'	1972	0.1
I'	1973	0.05
J'	1974	0.05
K'	1975	0.05
L'	1976	0.05
M'	1977	0.1
N'	1978	0.1
O'	1979	0.1

GRAFICA 1. COEFICIENTE DE MORBILIDAD.



GRAFICA 2. COEFICIENTE DE MORTALIDAD.



Por otra parte, sabemos que los índices de Morbilidad no siempre son de gran confiabilidad, ya que no se obtienen de la población en general, como es necesario para estimar la verdadera frecuencia; los datos con los que se cuenta provienen de clínicas, hospitales y de las instituciones de salud, pertenecientes principalmente al sector público, que solo atienden a pacientes de mediana o elevada gravedad. Los casos benignos, que son la mayoría, no son registrados por no requerir habitualmente atención médica.

Es indudable que este problema sanitario en nuestro país exige que se le ponga atención, buscando medidas profilácticas. Sin embargo, para lograr esto con éxito es necesario conocer más a fondo los agentes infecciosos que con mayor frecuencia son causantes de Tifo, así como conocer sus mecanismos de transmisión, patogenicidad, respuesta inmunitaria, métodos efectivos de diagnóstico, etc. Solo de esta manera podremos controlar realmente el problema del Tifo en la República Mexicana.

La Fiebre de las Trincheras causada por Rickettsia quintana; es una enfermedad infecciosa, caracterizada por fiebre de corta duración, recurrente, acompañada de dolores especialmente en las tibiae. Es una enfermedad endémica y en condiciones favorables puede hacerse epidémica. Se ha encontrado el agente causal en varias partes del mundo, incluyendo México.

Debido, probablemente a que no se toma en cuenta la existencia de este padecimiento y las dificultades que tiene su diagnóstico, no se conoce de una manera verdadera su completa distribución. Aún cuando la Fiebre de las Trincheras aparece por ser endémica en muchas áreas del mundo, el reconocimiento total de la enfermedad ha sido impedido por la dificultad de realizar un diagnóstico clínico exacto y la ineficacia de un procedimiento simple de laboratorio para establecer la etiología.

Tomando en cuenta las estadísticas anteriores; que no existen datos de 1979 a la fecha, así como los recientes avances en -

la detección de Tifo en México por parte del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la Secretaría de Salud; para este estudio se decidió adoptar una técnica sensible, confiable, específica y de fácil manejo por medio de la cual los resultados, - permitieran conocer la existencia de uno de los agentes causales de éste padecimiento en nuestro país.

TIPO EPIDEMICO

El Tifo Epidémico transmitido por piojos, es una enfermedad que aún es causa mayor de morbilidad y mortalidad en algunas partes de Africa y que también se encuentra presente en partes de -- América y Asia. Esto se debe a un incremento de la actividad exterior y a la migración de gente a las grandes ciudades. Debido a esto, y después de un gran período de estancamiento, las enfermedades rickettsiales, son de nuevo, sujeto de interés y nuevos accesos para su estudio han sido desarrollados; esto por el reconocimiento de que las enfermedades rickettsiales persisten, y son causa importante de morbilidad y mortalidad en ciertas ciudades.

El Tifo Epidémico transmitido por piojos; una de las mayores enfermedades epidémicas de la historia, se propaga durante tiempos de guerra y disturbios civiles, y también, se presenta donde los modelos socioeconómicos son bajos y donde el piojo es abundante.

En el presente siglo el principal foco de infección de la enfermedad ha sido en la región montañosa del norte y este de Africa y Europa, en América Central y noroeste de América y Asia (17).

No obstante, la existencia de condiciones favorables para la propagación de la enfermedad, el desarrollo de insecticidas y su aplicación masiva para control del vector, ha hecho posible disminuir un poco el alcance de las epidemias. El desarrollo de vacunas específicas ha contribuido significativamente al control de la enfermedad. Desde entonces el número de ciudades con casos reportados de Tifo ha disminuido considerablemente.

Brezina en 1973 (17) menciona que la mayoría de los casos se han reportado en el este de Africa; y toma como ejemplo la epidemia de Burundi en 1933-34, 1939 y 1945-46; donde se registraron - 429 muertos y el número de piojos registrado por persona fué de - 40 aproximadamente.

GENERALIDADES

El Tifo Epidémico o Exantemático hizo estragos en la Guerra de Treinta Años en el siglo XVII, las Guerras Napoleónicas (entre el XVII y XIX). Nicolle en Turquía en 1899 incriminó al piojo como vector del Tifo Epidémico, y De Rocha Lima y Von Prowazek identificaron rickettsias en tejidos de piojo en 1914. En 1915 Weil y Felix reportaron la reacción de Proteus OX 19, seguida de la demostración de que el suero de pacientes convalescentes de Tifo aglutinaron bacilos Proteus. En 1910 Brill, reportó una serie de 211 pacientes observados por él de 1898 a 1910 que asemejaron fiebre tífica moderada. Mucho tiempo después Zinsser documentó que los casos Brill fueron Tifo recrudesciente que se repite años después de la enfermedad. Este fenómeno es ahora llamado Enfermedad de Brill-Zinsser (28,64).

El nombre de rickettsias que se da a estos microorganismos se instituyó en 1916 en honor de Hollard Taylor Ricketts, quien descubrió en colaboración con R.M Wilder, el agente etiológico del Tifo en piojos que se habían alimentado en pacientes afectados de la enfermedad. H.T Ricketts, fué también el primero que descubrió formas bacilares de rickettsias en sangre de enfermos de la Fiebre Patequial de las Montañas Rocosas. El organismo que causó el Tifo Exantemático se denominó Rickettsia prowazekii en memoria de Von Prowazek, otro pionero de las investigaciones sobre el Tifo, y que al igual que H.T Ricketts murió al contraer la enfermedad en el curso de su trabajo (16,92).

En Japón y Corea en 1946-1947 se dieron 30,000 casos de Tifo (99). Durante la Primera Guerra Mundial hubo en Servia, en 1925, una epidemia de Tifo que en 6 meses produjo 25,000 defunciones -- por mes y en Rusia hubo aproximadamente 50 millones de casos entre 1919 y 1922 (76).

Ruiz Castañeda fué el primero en preparar una vacuna contra el Tifo al igual que Cox.

Toda una serie de gérmenes desconocidos biológicamente por las razas americanas, entre ellos el causante del Tifo, que dió origen a Pediculis vestimentis infectados, contribuyeron a la conquista más que las armas de fuego, las de hierro y acero, más que los caballos y perros de presa. En el siglo XVIII las repetidas epidemias de Tifo causaron tal mortalidad que se calcula perecieron en ellas dos terceras partes de los habitantes de la Nueva España. En el siglo XIX (1813) la Ciudad de México tenía 123,907 habitantes y de ellos murieron 20,395 por las llamadas "fiebres mictéricas" causadas por Tifo, Tifoidea y Paludismo. Continuaron en los cien años de 1820 a 1920 los brotes epidémicos de Tifo en regiones de clima frío y templado (40).

En México, es probable que ninguna otra enfermedad aparte -- del Paludismo, logre superar al Tifo como origen de sufrimientos humanos. Existen otras rickettsiosis que son causa también de muchos padecimientos y miseria, pero ninguna de ellas ha tenido intervención tan decisiva en el curso de la historia como el Tifo Epidémico (99).

El desarrollo del turismo, comunicaciones rápidas y el turismo internacional, han hecho posible esta propagación de la enfermedad. También se ha enfatizado en que la presencia y diseminación de la infección y enfermedad, han dificultado las medidas preventivas y de control (17).

Rickettsia quintana

(Fiebre de las Trincheras)

A).- Definición e Historia.

La Fiebre de las Trincheras es una enfermedad infecciosa, generalmente benigna, caracterizada por fiebre de corta duración y recurrente, acompañada de dolores, especialmente en las tibias. Sin embargo, el cuadro clínico de este padecimiento puede tener variaciones considerables.

Se le conoce también con los nombres de Fiebre de Wolhynia, Fiebre de cinco días, Fiebre quintana, Fiebre de Moldano Wallachian, Enfermedad de Weigl, Trancazo, Fiebre tibiálgica, Fiebre de piernas, Enfermedad de His-Werner, Fiebre intermitente, Polaco Ruso y Fiebre de Meuse.

Las principales investigaciones de esta enfermedad parten de la Primera Guerra Mundial, donde se realizaron pesquisas acerca de esta. Durante la Segunda Guerra Mundial la Fiebre de las Trincheras fué estudiada por el ejército alemán, por Rusia y Polonia. Al final de estas hostilidades se aislaron cepas en Yugoslavia, y estas mismas cepas fueron objeto de investigaciones en Zurich y Boston.

Desde 1954, Varela y colaboradores (122) encontraron el agente de la Fiebre de las Trincheras en la Ciudad de México, siendo la primera vez que se le identificó en las Américas. El nombre con que se le conoce más comunmente al agente etiológico es Rickettsia quintana.

Aunque la Fiebre de las Trincheras aparece por ser endémica en muchas áreas del mundo, el reconocimiento de la enfermedad ha sido impedido por la dificultad de preparar un diagnóstico clínico y la ineficacia de un procedimiento de laboratorio simple para

establecer la etiología, la prolongada rickettsiemia en la Fiebre de las Trincheras por un periodo relativamente grande, hace que el cultivo de sangre pueda ser útilmente empleado.

Aunque Rickettsia quintana puede aparecer o existir en equilibrio ecológico con su hospedero humano y el piojo como vector en muchas áreas del mundo, el reconocimiento de la Fiebre de las Trincheras ha sido limitado principalmente para las epidemias de gran escala de la Primera y Segunda Guerra Mundial. Entre epidemias, la enfermedad disminuye dentro del estado endémico, y reportes de casos primarios desaparecen de la literatura médica. La dificultad de realizar un diagnóstico clínico de la Fiebre de las Trincheras en ausencia de una epidemia y, como se mencionó, la ineficacia de un procedimiento de laboratorio para establecer la etiología de la infección, ha contribuido significativamente a carecer del reconocimiento de la enfermedad clínica en áreas endémicas durante periodos epidémicos (125).

B).- Clasificación.

El agente etiológico de las enfermedades rickettsiales en los humanos constituye un grupo biológicamente distinto de microorganismos dentro de la Familia Rickettsiaceae. Una lista de enfermedades, agente etiológico, clasificación taxonómica y otra información ecológica pertinente, es presentada en la Tabla II. Basado en similitudes de composición antigénica y otros atributos comunes, las patógenas al humano se incluyen dentro de la Tribu Rickettsiaceae y se clasifica en 3 Géneros:

I.- Género Rickettsia con 3 Biotipos

- 1.- Grupo Tifus.
- 2.- Grupo de la Fiebre Manchada.
- 3.- Grupo de la Fiebre de los Matorrales.

II.- Género Rochalimaea que incluye al agente de la Fiebre de las Trincheras.

TABLA II. ENFERMEDADES POR RICKETTSIAS EN EL HOMBRE.

BIOTIPO	AGENTE ETIOLOGICO	ENFERMEDAD Y SINONIMIAS	TRANSMISION A HUMANO	DIAS DE INCUBACION	DISTRIBUCION GEOGRAFICA	CICLO NATURAL DE INFECCION	ARTROPODO	MAMIFERO
GRUPO TIPO	<u>Rickettsia prowazekii</u>	Tifo Epidémico, transmitido por piojo o exantemático.	Heces infeg tadas del piojo en la piel agrietada o por inhalación.	6-15	Mundial excepto Australia.	Piojo del cuerpo, piojo de ardilla y pulga.		Humanos; ardilla voladora (USA).
	<u>Rickettsia prowazekii</u>	Enfermedad de Brill-Zinsser, Tifo esporádico o recrudescente.	Reactivación de infección latente años después del Tifo Epidémico Primario.		Mundial.			
	<u>Rickettsia typhi</u>	Tifo Murino, Endémico, urbano o transmitido por pulga.	Heces de pulga infectada sobre la piel agrietada.	6-14	Mundial.	Pulga de rata.		Rodedores.
GRUPO FIEBRE MANCHADA	<u>Rickettsia rickettsii</u>	Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, Fiebre Manchada Tifo de Sao Paulo.	Picadura de garrapata.	3-12	Henisferio occidental.	Garrapata.		Animales silvestres pequeños y medianos, pájaros y perros
	<u>Rickettsia conorii</u>	Fiebre botonosa o Marsellesa y Fiebre por picadura de garrapata de Sudáfrica.	Picadura de garrapata.	5-7	Ciudades del Mediterraneo, Africa e India.	Garrapata.		Pequeños animales silvestres y perros

	<u>Rickettsia australis</u>	Tifo por garrapata de Queensland.	Picadura de garrapata.	7-10	Australia.	Garrapata.	Pequeños roedores silvestres y marsupiales.
	<u>Rickettsia sibirica</u>	Tifo por garrapata de Siberia o rickettsiosis transmitidas -- por garrapata en el Norte de Asia.	Picadura de garrapata.	2-7	Siberia y Mongolia.	Garrapata.	Animales silvestres y domésticos, pájaros.
	<u>Rickettsia akari</u>	Rickettsialpox, rickettsiosis vesicular.	Picadura de ácaro.	7-10	Noreste de USA y USSR.	Acaros chupadores de sangre.	Ratón de casa.
GRUPO DE LOS MATORRALES	<u>Rickettsia tsutsugamushi</u>	Tifo de los Matorrales y tropical; enfermedad tautsugamushi.	Picadura de ácaro.	5-21	Asia, Australia e Islas del Pacífico.	Acaros trombiculoides.	Pequeños roedores silvestres y pájaros.
FIEBRE DE LAS TRINCHERAS	<u>Rochalimaea quintana</u>	Fiebre de las Trincheras o Fiebre de cinco días.	Heces de pigo infectadas sobre piel agrietada.	9-17	Europa, Norte de Africa y México.	Piojo del cuerpo.	Humanos.
FIEBRE Q	<u>Coxiella burnetii</u>	Fiebre Q o Gripe Balcánica.	Inhalación de aerosol infectado.	7-17	Mundial.	Garrapata.	Pequeños mamíferos silvestres, Ganado, carnero, cabras sin artrópodos como vector.

III.- Género *Coxiella* que incluye al agente de la Fiebre Q o Fiebre de Queensland.

Los 2 Grupos del Género Tifus son similares en crecimiento y metabolismo, estructura fina y propiedades patógenas en el hombre pero difieren en su tamaño, ubicación intracelular, comportamiento extracelular y composición antigénica (16,73).

C).- Morfología.

Las especies de rickettsias son figuras rojas, elipsoidales, coccoides, diplococoides y ocasionalmente microorganismos filamentosos de cerca de 0.3-0.5 um de diámetro y 0.8-2.0 um de largo, - ellas dan una reacción de tinción G(-) y *Coxiella burnetii* una -- tinción G(+) (44). Aunque ellas son definitivamente diferentes en la apariencia morfológica en las diferentes especies, esos rasgos son raramente de valor en su identificación (73).

Algunos investigadores (16) han postulado que la variación morfológica representa un ciclo de desarrollo, pero esta opinión no es generalmente aceptada. Las rickettsias en fase logarítmica de crecimiento tienen típicamente formas bacilares, y en la fase estacionaria son a menudo coccoides, filamentosas o hinchadas, pero no hay evidencia de que este pleomorfismo refleje un ciclo de desarrollo.

Las rickettsias se tiñen de rojo con las técnicas de Machiavello y Giménez y de púrpura con el colorante de Giemsa. Únicamente anticuerpos inmunofluorescentes específicos pueden diferenciar definitivamente entre rickettsias y otros microorganismos, por medio de una coloración. La ultraestructura de las rickettsias es típica de las bacterias gramnegativas (3); un complejo de 5 capas de la pared celular y membrana plasmática, rodea al citoplasma que contiene gran cantidad de ribosomas y cadenas de DNA. No se observan estructuras nucleares bien definidas. Se sugiere un -

centro organizado de DNA que puede estar físicamente conectado con ribosomas del citoplasma que contienen RNA. Son comunes vacuolas intracitoplasmáticas y las invaginaciones de la membrana plasmática.

Silverman y Wisseman (114) en 1974, demostraron la existencia de una zona en la superficie externa de las rickettsias, y la llamaron capa mucus y no cápsula por su tendencia a filtrarse. Las semejanzas morfológicas con las bacterias gramnegativas son notables, pero parece haber también diferencias funcionales significativas.

Rickettsia quintana mide de 0.2 a 0.5 μ m de ancho y alto por 1.6 μ m de largo. Su pared celular exterior tiene 80 A de grueso y la membrana plasmática 70 A; cada una trilaminar. Estudios realizados por Ito y Vinson en 1965 (61), demostraron que también están presentes ocasionalmente invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática debido a su contenido de baja densidad electrónica. Su material nuclear, distribuido en zonas irregulares a lo largo del citoplasma aparece como una red suelta de fibras finas. El citoplasma es atestado de numerosos gránulos, probablemente ribosomas, de cerca de 150 A de diámetro. Durante la fisión binaria, un estrecho surco es formado por la red celular y el plasmalemma.

El contorno de las rickettsias es generalmente plano, con ciertas irregularidades. Algunas especies muestran surcos o bulbos de la pared celular. Esto se puede deber a la preparación de la técnica, degeneración o condiciones de crecimiento no óptimas. El plasmalemma es ocasionalmente vesicular midiendo arriba de 15 μ m de diámetro y semejante a las vesículas pinocíticas o vacuolas vistas en las células animales.

Rickettsia quintana es un tanto pequeño en tamaño, y algunas formas son capaces de pasar a través de filtros que retienen otras rickettsias (33,29).

Recientes exámenes de microscopía electrónica de secciones ultrafinas, han revelado estructuras adicionales semejantes a la de las bacterias gramnegativas. En la mayoría de las microfotografías electrónicas de rickettsias, se observa una pared celular trilaminar y una membrana plasmática trilaminar fundamental, pero con mayor resolución se ha demostrado una pared celular de 5 capas (73).

En algunas especies se ha observado una cápsula externa y su periferia semejante a una capa (90,114).

D).- Composición Química y Metabolismo.

Las similitudes de rickettsias con bacterias son:

- 1.- Ambas se dividen por fisión binaria (109).
- 2.- Ambas contienen DNA y RNA (2), y el tamaño del genoma ha sido estimado en 1.5×10^6 pares de nucleótidos, que es comparable con otros microorganismos de tamaño similar (65).
- 3.- La pared celular de las rickettsias contiene ácido murámico, un componente esencial de mucopéptidos, característicamente descubiertos en la pared celular de todas las bacterias estudiadas (100).
- 4.- Contienen ácido diaminopimélico, limitado para el mucopéptido de todas las bacterias excepto cocos grampositivos, y ha sido demostrado en cuatro especies de rickettsias estudiadas (86).
- 5.- Exhiben actividad endotóxica (22).

Análisis químicos de suspensiones de rickettsias purificadas y paredes celulares derivadas de ello, han demostrado carbohidratos, proteínas y componentes lipídicos y complejos semejantes a la composición de las bacterias gramnegativas (20,110). Diferencias pequeñas pero distintivas en la composición base de DNA (porcentaje molar de guanina mas citosina) se han demostrado para diferenciar los Biotipos de rickettsias (117). Todas las rickettsias -

son parásitos intracelulares obligados con excepción de Rickettsia quintana que ha sido cultivada en un medio libre de células (22). Sin embargo, numerosas actividades enzimáticas que involucran varios sistemas, se han identificado en organismos intactos en un medio libre de células (41, 131). Estas son diferencias significativas entre las especies rickettsiales en su habilidad para utilizar glutamato, glutamina, piruvato y succinato, y la caracterización de las actividades metabólicas puede proveer información en la filogenia de estos microorganismos (133).

Brezina en una revisión de rickettsias realizada en 1973 (17), afirma que estos microorganismos poseen pared celular compleja, contienen DNA y RNA, sintetizan sus propias estructuras y constituyentes funcionales con sus propias enzimas, y generan uniones fosfato de alta energía, unido con energía derivada de la oxidación de aminoácidos y carbohidratos. La pared celular de las rickettsias es muy parecida a la pared celular de las bacterias gramnegativas en complejidad de su estructura y en presencia de los componentes ácido murínico y diaminopimélico. Análisis más amplios han mostrado la presencia de 12-15 aminoácidos, incluyendo lisina y ácido diaminopimélico, y la presencia de glucosamina y ácido murínico.

El complejo de la membrana externa de Rickettsia quintana ha sido aislado, y se ha encontrado que esta constituida de proteínas y componentes lipopolisacáridos. La actividad de la membrana externa fué confinada al componente lipopolisacárido, el cual ha sido identificado como 2-ceto-3-deoxi-octanato y heptosa (55). El ácido teicoico característico de las bacterias grampositivas, no ha sido encontrado.

La producción de energía es acompañada aparentemente desde el inicio de la operación por el Ciclo de Krebs. En el caso de Rickettsia quintana el principal sustrato de energía es el gluta

mato. La oxidación se acompaña de fosforilación. Las rickettsias poseen mecanismos enzimáticos para la descomposición de carbohidratos, uniones fosfato de alta energía, y síntesis de lípidos y proteínas. La célula hospedera contribuye probablemente a incluir sustratos primarios tales como glutamato y piruvato, factores tales como ATP, NAD, Coenzima A además de aminoácidos.

Internamente son evidentes ribosomas y hélices de DNA (3, 4 61, 114). Las rickettsias contienen también RNA, que incluye RNA de transferencia y ribosomal. Myer y Wiseman en 1980 (91), -- afirmaron que el tamaño del genoma es de aproximadamente de 1×10^9 daltons. Tveryar y colaboradores (117) analizaron la composición básica de DNA de las rickettsias y encontraron una diferencia pequeña pero definitiva en el porcentaje molar de guanina más citosina (G + C). El contenido para el Grupo Tifus fué de 30 moles %, Grupo Fiebre Manchada 32.5%, y Género Rochalimaea 38.6%. (16).

En general las rickettsias son inestables cuando se encuentran aisladas, dejando escapar metabolitos, son permeables a moléculas del tamaño de los nucleótidos y tienen propiedades de endotoxinas y hemolisinas (71).

Los sustratos esenciales de las rickettsias deben provenir de la célula huésped. La respiración es estimulada principalmente por glutamato y en menor escala por glutamina, a la que las rickettsias deben desaminar a glutamato. Glucosa, glucosa-6-fosfato, lactato, sacarosa y aminoácidos naturales no estimulan la respiración. Las rickettsias como se mencionó anteriormente, también sintetizan lípidos pero en muy pequeña escala, análogamente a su síntesis de proteínas. Estas actividades sintéticas requieren la donación desde fuera de las rickettsias de sustratos complejos que dan energía incluyendo ATP. Dada la composición química y la semejanza estructural entre rickettsias y otras bacterias gramnegativas, hay sin duda alguna diferencia fundamental entre ambas que -

mato. La oxidación se acompaña de fosforilación. Las rickettsias poseen mecanismos enzimáticos para la descomposición de carbohi-- dratos, uniones fosfato de alta energía, y síntesis de lípidos y proteínas. La célula hospedera contribuye probablemente a incluir sustratos primarios tales como glutamato y piruvato, factores ta-- les como ATP, NAD, Coenzima A además de aminoácidos.

Internamente son evidentes ribosomas y hélices de DNA (3, 4 61, 114). Las rickettsias contienen también RNA, que incluye RNA de transferencia y ribosomal. Myer y Wiseman en 1980 (91), -- afirmaron que el tamaño del genoma es de aproximadamente de 1×10^9 daltons. Tveryar y colaboradores (117) analizaron la composi-- ción básica de DNA de las rickettsias y encontraron una diferen-- cia pequeña pero definitiva en el porcentaje molar de guanina más citosina (G + C). El contenido para el Grupo Tifus fué de 30 moles %, Grupo Fiebre Manchada 32.5%, y Género Rochalimaea 38.6 % (16).

En general las rickettsias son inestables cuando se encuen-- tran aisladas, dejando escapar metabolitos, son permeables a molé-- culas del tamaño de los nucleótidos y tienen propiedades de endo-- toxinas y hemolisinas (71).

Los sustratos esenciales de las rickettsias deben provenir de la célula hosped. La respiración es estimulada principalmente por glutamato y en menor escala por glutamina, a la que las rickett-- sias deben desaminar a glutamato. Glucosa, glucosa-6-fosfato, lac-- tate, sacarosa y aminoácidos naturales no estimulan la respira-- ción. Las rickettsias como se mencionó anteriormente, también sín-- tetizan lípidos pero en muy pequeña escala, análogamente a su sín-- tesis de proteínas. Estas actividades sintéticas requieren la do-- nación desde fuera de las rickettsias de sustratos complejos que dan energía incluyendo ATP. Dada la composición química y la seme-- janza estructural entre rickettsias y otras bacterias gramnegati-- vas, hay sin duda alguna diferencia fundamental entre ambas que --

impide el crecimiento extracelular de las rickettsias.

La muerte rápida de rickettsias extracelulares pueden retardarse por suspensión en un medio compuesto de sacarosa y glutamato en un buffer de fosfato de potasio a pH 7 (PGS). Este medio -- creado por Bovarnick y colaboradores (12), se ha usado mucho -- para sustentar rickettsias durante purificación, estudios metabólicos y titulaciones. Su rendimiento mejora con el agregado de -- soro-albúmina. En un esfuerzo para mejorar la puesta de rickettsias en placas, Wike y colaboradores (136) demostraron que la -- inefectividad y estabilidad extracelulares podían mantenerse más satisfactoriamente durante breves períodos si las rickettsias se suspendían en caldo de infusión cerebro corazón.

Cepas de rickettsias bien adaptadas crecen en gran abundancia en el citoplasma celular, empujando a menudo el núcleo a un lado (16). Ciertas proteínas son sintetizadas en pequeñas cantidades por rickettsias, y la formación de estas macromoléculas es inhibida por los antibióticos (64).

E).- Propiedades Físicas.

Los organismos contenidos en la Tribu Rickettsia son relativamente lábiles y son fácilmente inactivados en el laboratorio -- por condiciones desfavorables. Son destruidas rápidamente por formaldehído, fenol al 1%, hipoclorito de sodio, desinfectantes, alcohol etílico al 70% y radiación ultravioleta. A temperatura de -- 56°C o superiores, su viabilidad es menor a 30 minutos. Títulos -- infectivos de suspensiones de rickettsias en solución salina fisiológica (buffer), declinan rápidamente después de varias horas en un cuarto de temperatura y después de 24 horas a 0 - 4°C.

El pH óptimo de supervivencia es de 7, y se observan pequeñas diferencias en un rango de 6.5 a 7.4.

Diferentes tipos de medio se han recomendado durante mucho --

tiempo para utilizarse como diluentes para preservar la actividad biológica de las diferentes especies de rickettsias durante el intento de aislamiento, procedimientos de purificación y medida de los títulos de infectividad y toxicidad así como para estudios de actividad metabólica. El diluyente Sacarosa PG conteniendo Sacarosa, alta concentración de ión potasio, y glutamato, que ha sido utilizada ampliamente, generalmente conserva títulos infectivos de suspensiones de rickettsias por varias horas en un cuarto de temperatura y por más de una semana a $0-4^{\circ}\text{C}$ y protege contra la inactivación causada por el congelamiento y descongelamiento (12).

Debido al alto contenido de potasio, este diluyente puede ser tóxico en animales, particularmente aplicado intravenosamente. La inactividad de las suspensiones rickettsiales en Sacarosa PG es sostenida por grandes períodos de tiempo por congelamiento a temperaturas de -65°C o menores. Este proceso de congelación en seco conserva la actividad por más de un año (73).

F).- Composición antigénica.

La clasificación y composición antigénica de las rickettsias puede apreciarse en la Tabla III.

Cheng en 1953 (24), observó la habilidad de ciertos complejos polisacáridos de antígenos bacterianos para absorberse firmemente sobre eritrocitos y de este modo hacerlos aglutinables por antisueros específicos, y estudió este fenómeno para las rickettsias. De rickettsias del grupo Tifus se ha aislado una substancia sensibilizadora de eritrocitos (ESS) serologicamente activa, por medio de calentamiento de suspensiones de rickettsias diluidas en solución alcalina a 100°C . Las suspensiones son tomadas de sacos vitelinos homogenizados de embriones de pollo. Su titulación se hace por reacciones de aglutinación, donde la formación de botón indica reacciones negativas y la reacción positiva se indica por

TABLA III. CLASIFICACION Y COMPOSICION ANTIGENICA DE RICKETSIAS.
 REACTIVIDAD INMUNOLOGICA DE LOS ANTIGENOS

BIOTIPO Y SUBGRUPO	ESPECIES **	INMUNO-TIPOS (NUMERO)	SOLUBLE FIJACION DE COMPLEMENTO	SUBSTANCIA SENSIBILIZANTE DE ERITROCITOS	CORPUSCULAR				AGLUTINACION DE PROTEUS WEIL-FELIX
					CF	MICRO-IF	AGLUTI NACION	TOXINA	
GRUPO TIPO	<i>R. prowazekii</i>	1***	GS**	GS	SS*	SS	SS	SS	OX ₁₉
	<i>R. typhi</i>	1	GS	GS	SS	SS	SS	SS	OX ₁₉
	<i>R. canada</i>	1	GS	ND	SS	SS	SS	SS	ND
	A <i>R. rickettsii</i>	1	GS	GS	SS	SS	SS	SS	OX ₁₉ o OX ₂
	<i>R. sibirica</i>	1	GS	ND	SS	SS	ND	SS	" "
	<i>R. conori</i>	1	GS	GS	SS	SS	SS	SS	" "
GRUPO FIEBRE MANCHA DA	B <i>R. parkeri</i>	1	GS	ND	SS	SS	ND	SS	ND
	C <i>R. akari</i>	1	GS	GS	SS	SS	SS	N	N
	<i>R. australis</i>	1	GS	ND	SS	SS	ND	N	OX ₁₉ o OX ₂
	D <i>R. montana</i>	1	GS	ND	SS	ND	ND	N	ND
	Montana U Oeste	1	GS	ND	SS	ND	ND	N	ND
	E Pakistan JC-880	1	GS	ND	ND	ND	ND	SS	ND
	Thai TT-118	1	GS	ND	ND	ND	ND	SS	ND
GRUPO FIEBRE DE LOS MATORRA LES	<i>R. tsutsugamushi</i>	8	SS	N	SS	SS	ND	SOLO 3 CEPAS	OXK
FIEBRE DE LAS TRINCHERAS	<i>Rochalimaea quintana</i>	DESCONOCIDO	SS	N	SS	ND	ND	N	N
FIEBRE Q	<i>Coxiella burnetii</i>	2 FASES	N	N	SS	SS	SS	N	N

*-ESPECIFICA DE ESPECIE

** ESPECIFICA DE GRUPO

***-CEPA MADRID E, ES UNA VARIANTE CON VIRULENCIA REDUCIDA PERO ES INALTERADA INMUNOLOGICAMENTE

ND-NO DADA O REALIZADA

N -NINGUNA

lisis de eritrocitos. La preparación de ESS se conserva hasta por cuatro meses a 2-4°C.

Las rickettsias poseen antígenos somáticos y capsulares. Las rickettsias que infectan al hombre producen una endotoxina que se neutraliza por un antisuero específico de grupo. Producen también una hemolisina que destruye los hematies de conejo (99).

Cooper y colaboradores en 1976 (30), demostraron que los antígenos de Rickettsia quintana son dos proteínas; una termolábil y una termestable.

Para las rickettsias en general, una fracción antigénica termolábil capaz de inducir protección después de una simple vacunación de animales, fué obtenida del antígeno soluble. La vacunación del ser humano con este antígeno no provoca reacción local o general (17).

Antígenos específicos fijadores de complemento se han preparado de Rickettsia quintana cultivada en agar sangre suplementado. El tratamiento con éter, de suspensiones de organismos de Fiebre de las Trincheras, libera un antígeno soluble en baja concentración (126). No ha sido aislada una sustancia sensibilizante de eritrocitos (ESS) para Rickettsia quintana, y el efecto tóxico es desconocido. Tampoco existe información acerca de las diferencias antigénicas entre cepas de este microorganismo. Tomando en cuenta que no se han encontrado diferentes serotipos, se hacen necesarios nuevos estudios (73).

G).- Mecanismo de Patogenicidad y Manifestaciones Clínicas.

La enfermedad se desarrolla en los humanos comúnmente como resultado de un encuentro accidental con un artrópodo infectado. La infección en el artrópodo por las rickettsias ocurre por una inoculación directa en la boca del artrópodo al tiempo de alimentarse. Con el bicho y pulga infectados, la infección resulta cuan

de las heces del artrópodo conteniendo la rickettsia que se multiplicó en las células de la pared intestinal, son frotadas o excretadas dentro de la piel lesionada o dentro de las conjuntivas. Una vez que las rickettsias han penetrado en la piel, ellas se multiplican dentro de las células, alcanzan la corriente sanguínea, y eventualmente llegan a localizarse en las células endoteliales de pequeñas venas, arterias y capilares. Estas células endoteliales infectadas aumentan, degeneran y causan la formación de trombos - con parcial o completa oclusión del lumen vascular. Una necrosis focal de las paredes de los vasos pequeños propician un incremento en la permeabilidad, ruptura, petequias y hemorragias. La ruptura de vasos y la trombosis interrumpen el suministro de sangre causando macro y microinfartos y necrosis del tejido (17).

Se inicia una respuesta celular localizada con la formación de nódulos, comunmente en el bazo, hígado, riñones, cerebro, corazón y músculo esquelético. Una miocarditis aguda no supurativa, - difusa y local, acontece comunmente. Aparte del daño vascular causado por los organismos o sus toxinas, son raras otras lesiones. La rickettsiemia esta presente a lo largo del período febril agudo. Las características patológicas que se incluyen son similares en muchas enfermedades rickettsiales; sin embargo, la extensión y grado de complicación varía y en general es indicado por la severidad de la enfermedad (71).

Después de un período de incubación variable, la enfermedad usualmente empieza súbitamente con fiebre y fuerte dolor de cabeza. Al tiempo de inicio de la enfermedad, una lesión primaria es evidente en el sitio de la infección. Aunque la lesión patológica básica en la infección rickettsial es una vasculitis difusa, esta es una diferencia importante en la manifestación clínica y severidad de la enfermedad que es dependiente en la distribución y extensión de la lesión vascular.

Las manifestaciones clínicas de las enfermedades rickettsiales clásicas, cuando se presentan, son suficientemente distintivas para permitir al médico diferenciarla de otra enfermedad infecciosa viral o bacteriana. Sin embargo en la mayoría de los casos de sospecha de enfermedad rickettsial, como es una comprensión de la ecología básica y epidemiológica de la enfermedad y la historia del conocimiento a una posible exposición a artrópodos infectados, permiten un correcto diagnóstico clínico.

Después de un período de incubación las manifestaciones clínicas pueden agruparse en las siguientes fases o estadios.

1.- Prodrómico: Hay malestar general, cefalea; y lo común es que no se presente esta fase y que se instale de inmediato la siguiente fase.

2.- Fase de Estado: La iniciación es súbita y se presentan fiebre elevada, precedida por calosfrío, cuando se deja a libre evolución tiende a elevarse hasta 41°C, es sostenida y con duración de 2-3 semanas; hay cefalea muy intensa que llega a ser intolerable, puede acompañarse de vértigos y ataque al estado general con gran prostración. A la exploración se encuentra que la piel está seca, hay conjuntivitis muy marcada con fotofobia. El estado de conciencia se encuentra con alteraciones de cataplexia y delirio. Posteriormente se agregan tos seca, náuseas y vómito, sordera y rubicondus facial al cabo de 3-4 días y se llega a la fase siguiente.

3.- Fase de Exantema: El exantema comienza en forma de máculas eritematosas en las axilas y flancos que se extiende al tronco y finalmente a las extremidades. Al iniciarse la fase eruptiva aumenta la intensidad de la cefalea, de la tos y se hace más marcado el estado de sopor.

4.- Enfermedad de Brill-Zinsser es una recrudesencia en donde

Las manifestaciones clínicas son moderadas, no hay erupción y la mortalidad es nula.

En la Fase de Estado, el Tifo puede confundirse con Viruela, Fiebra Tifoidea, Paludismo, Meningitis meningocócica ó Sarampión en los niños. El cuadro clínico en los niños es menos grave y el exantema puede ser discreto. Puede ayudar la cefalea intensa, la conjuntivitis con derrames hemáticos subconjuntivales y los antecedentes socioeconómicos (71).

La muerte ocurrida tempranamente en la fase aguda de la enfermedad es debida generalmente a un colapso vascular; cuando esto ocurre, posteriormente es relacionada a un daño vascular crónico produciendo necrosis y trombosis.

La gran supervivencia de las rickettsias en varios órganos y tejidos linfáticos después de la infección en hombres y animales es una característica general en la patogénesis de la enfermedad rickettsial.

La fisiopatología se ha estudiado en huéspedes experimentales que incluyen monos. Cada especie patógena causa no obstante algunas infecciones humanas y animales que pasan totalmente inadvertidas, y otras que son tan graves que llevan a la muerte. Por ahora no hay marcadores definidos para distinguir entre rickettsias virulentas y avirulentas en términos de respuesta del huésped a la infección, ni tampoco hay evidencia clara de ningún mecanismo de fisiopatología inducida por rickettsias, a partir de la invasión celular por parte de las rickettsias vivas. En general la virulencia de las rickettsias para los animales de laboratorio no es paralela para su virulencia en el hombre (16).

Las rickettsias penetran en casi todas las células de los mamíferos fijándose a la membrana celular y luego por fagocitosis. La fijación no es un proceso casual, se requiere de un contacto -

estrecho y la participación activa de las rickettsias. Ramo y Winkler (105) en 1973, comprobaron que el eritrocito tiene un receptor para rickettsias, un complejo lipídico neutro de colesterol y ácido palmítico. Una vez dentro de la célula, las rickettsias virulentas pueden escapar del fagocitoma antes de que este se fusione con el lisosoma, y así sobreviven para multiplicarse libremente en el citoplasma celular (16).

La Fiebre de las Trincheras es una enfermedad virtualmente no mortal en casos sin complicaciones (73). Varela y Buentello en 1961 (122), encontraron que en la Ciudad de México, el microorganismo de la Fiebre de las Trincheras se localiza en el tracto intestinal de los piojos de cuerpo y de la cabeza; Pediculus humanus; var. corporis y capitis (123).

En la Fiebre de las Trincheras aparecen síntomas 5-7 días -- después de la infección. Se presenta un período febril de hasta 12 días, temperaturas de 39.4^oC o mayores, escalofrío, dolor de cabeza postorbital, dolor de cuerpo principalmente en espinillas. Recaidas con intervalo de 4 días, dolor de huesos y muscular (124), y se presenta un 10-20% de mortalidad (60).

Leucocitosis o leucopenia, albuminuria y poliuria son frecuentes. La convalecencia es a menudo prolongada y presenta una gran variedad de complicaciones; entre las más comunes están los trastornos del sistema circulatorio y neurastenia. La orina y excremento de los enfermos es infecciosa. Oliguria, anuria, albuminuria y azotemia ocurre en pacientes con Tifo Epidémico. La oliguria y anuria resulta de una descompensación vascular e hipotensión. La azotemia resulta de dichas anormalidades vasculares y necrosis. La hepatomegalia también está presente (64).

La causa del marcado incremento en la permeabilidad capilar y hemorragia tisular es probablemente debida al efecto directo de

Las rickettsias, a sus toxinas, o a una combinación de ambos, o bien, a la relación antígeno-anticuerpo. Las anomalías fisiológicas ocurren en la segunda semana de la enfermedad cuando las fuerzas inmunes están presentes y cuando las lesiones patológicas son grandes. Trombocitopenia, protrombina aumentada, tiempo de -- Tromboplastina parcial aumentada y otras anomalías ocurren. -- Estos pacientes se recuperan sin tratamiento con heparina (14%).

Algunos autores (122) proponen las siguientes características de Fiebre de las Trincheras según la forma clínica de la enfermedad:

- 1.- Forma paroxística: en que la fiebre (39.5°C) aparece por -- 24 horas y es seguida por un período afebril de 2 a 3 días para reaparecer nuevamente. El número de brotes puede ser de uno a seis, rara vez más.
- 2.- Forma tifóidica: en la cual la fiebre no se interrumpe por espacio hasta de 2 semanas.
- 3.- Forma abortiva: en la que la fiebre puede durar unas cuantas horas y no tener recidivas.
- 4.- Hay ocasiones en que la fiebre es irregular siendo posible el diagnóstico solo por la rickettsemia.
- 5.- Existen también formas asintomáticas sin fiebre, pero en las cuales hay siempre rickettsemia.

Los convalescientes de la Fiebre de las Trincheras según los datos reportados (124), siguen infectando los piojos hasta por 443 días.

Rickettsia quintana ha sido aislada de sangre de pacientes -- después de 2 años de un ataque agudo, y verdaderas recaídas ocurren hasta 20 años después de un ataque primario. La rickettsemia crónica y estados de recaída son obviamente factores importantes que pueden dar salida a epidemias por Rickettsia quintana por gran

des periodos de tiempo (17, 71).

H).- Mecanismo de infección In vitro.

Ciertas especies de rickettsias han podido ser propagadas en varias líneas celulares primarias y continuas, derivadas de cultivos de tejidos aviares, de mamíferos y de insectos (70, 109).

En años recientes se han logrado avances significativos en la investigación de las rickettsias y su aplicación en cultivo de tejidos; en tanto al mecanismo de infección in vitro, no se han desarrollado estudios muy profundos que permitan conocer con exactitud este fenómeno.

Sin embargo, se han reportado estudios (60) de que en cultivos de células, las rickettsias del Tifo Epidémico al igual que el Murino y el de los Matorrales, son intracitoplasmáticos, y en el de la Fiebre Manchada sus rickettsias pueden penetrar tanto al citoplasma como al núcleo.

Las rickettsias propagadas en cultivo celular (58) e inoculadas intravenosamente a ciertos animales de experimentación, inducen interferón, pero los microorganismos son relativamente insensibles a esta acción in vivo e in vitro.

Lo que es bien cierto es que las rickettsias se multiplican única y exclusivamente en células con actividad metabolizante o en citoplasma viable de células enucleadas en un porcentaje relativamente bajo (14, 115, 145).

I).- Epidemiología.

Todos los agentes causales de las enfermedades rickettsiales tienen en común una asociación con ciertos artrópodos y, con excepción del Tifo Epidémico y Fiebre de las Trincheras, todas tienen ciclos de infección bien documentados en la naturaleza que involucran otros hospederos vertebrados que el humano. La endemici-

dad de las enfermedades en mantenerse por los ciclos de transmisión de los agentes rickettsiales de artrópodos infectados a artrópodos sin infectar por medio de un reservorio vertebrado. La transmisión transovárica en los artrópodos, es un importante mecanismo adicional para la conservación de la especie rickettsial. Recientemente rickettsias del Tifo Epidémico fueron aisladas de ardillas voladoras (Glaucomys volans velans) atrapadas en el Estado de los Estados Unidos (15), y los organismos aislados del ratón cuapastre conga diense (Microtus pennsylvanicus) en 1943 (5) han mostrado ser una causa de Rickettsia quintana, agente etiológico de Fiebre de las Trincheras (132). Aunque las implicaciones de salud pública de estos descubrimientos han sido determinadas, en el Tifo Epidémico y la Fiebre de las Trincheras el piojo del cuerpo humano es considerado como el más importante vector, y los humanos, son el hospedero preferido, el reservorio de la infección (73).

Una variedad de artrópodos y animales que sirven como hospedero de las especies de rickettsias, se presentan en la Tabla II. El ciclo de infección puede ser relativamente simple en el Tifo Epidémico y Fiebre de las Trincheras, que como se mencionó, involucra principalmente el piojo de cuerpo y los humanos.

Rickettsia quintana, el agente de Fiebre de las Trincheras, tiene hospederos muy limitados. Al igual que el hombre y piojo, varias especies de monos han mostrado ser infectados. Los intentos de infectar animales de laboratorio comunes han encontrado fracasos uniformes.

El hombre es el único reservorio conocido y el piojo de cuerpo y recientemente el ratón de campo (16, 132) los únicos vectores naturales.

Las heces de piojo se vuelven infecciosas de 5 a 10 días después de ingerir la comida infectante, aún cuando ellos mismos sean sanos. Esto se debe a que no hay puesta transovárica de Rickettsia

quintana en el piojo (17).

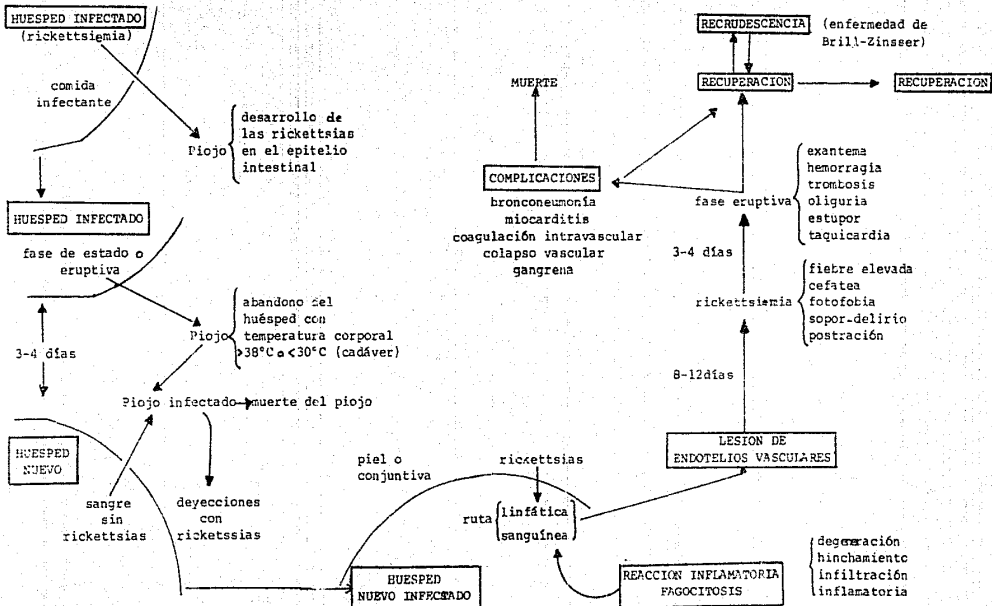
Las rickettsias patógenas al hombre se distribuyen ampliamente en muchos artrópodos y mamíferos. Entre estos se encuentra el piojo humano de cabeza y cuerpo, Pediculus humanus, que es el principal vector del Tifo Epidémico Clásico. En el piojo, la Rickettsia quintana infecta solo el epitelio intestinal, y la adquiere alimentándose con la sangre de un ser humano rickettsiémico. Después de algunos días las rickettsias en proliferación rompen las células epiteliales del intestino y aparecen en las heces del piojo. Esto muere generalmente por la infección de 7 a 10 días. Sus glándulas salivales no están infectadas y las rickettsias sobreviven por meses en las heces secas del piojo.

El único huésped experimental de Rickettsia quintana es el Mopos rhequa; como lo demostraron Mosser y Weyer en 1953 (81), pero el anticuerpo específico puede producirse en conejos y cobayos inmunizados con antígenos solubles o de células enteras en conéjvante de Freund (50).

Los piojos no toleran temperaturas menores de 30°C, ni mayores de 38°C, por lo que al presentarse la fiebre elevada o la muerte del enfermo, el piojo tiende a abandonar al paciente o cadáver. Dado que los piojos no pueden brincar ni volar y solo pueden caminar pocos metros, la transmisión epidémica del Tifo, implica condiciones de gran hacinamiento, promiscuidad y suciedad (personas que no se cambian de ropa, no se bañan ni asean su cabello); estas condiciones se presentan en tiempos de guerra, durante catástrofes naturales, en condiciones socioeconómicas muy precarias y especialmente en climas fríos.

La Enfermedad de Brill-Zinsser es una recrudescencia en un antiguo paciente de Tifo Exantemático y no es menester la presencia de piojos.

ESQUEMA I. EPIDEMIOLOGIA DEL TIPO.



La Fiebre de las Trincheras es endémica y en condiciones favorables puede hacerse epidémica. Se ha encontrado en la U.R.S.S., Polonia, Alemania, Checoslovaquia, Yugoslavia, Grecia, Turquía, Francia, Italia, Gran Bretaña, Siria, Israel, Túnez, Japón y México (122).

La Ciudad de México es endémica de Fiebre de las Trincheras. Rickettsia quintana se ha aislado de sangre de convalecientes -- hasta 3 años después del ataque agudo. Existe la presencia ulterior del microorganismo en tejidos, y puede ser transitoria o periódica (60).

Recientemente la ardilla voladora en muchos estados del Este de Estados Unidos ha sido implicada como hospedero infectante de rickettsias (15) y se han reportado varios casos en humanos -- que estuvieron en contacto con tales ardillas y sus ectoparásitos. Esto aunque el ciclo de transmisión ardilla-vector-humano no ha sido completamente aclarado.

Los principales focos de Tifo Epidémico en este siglo han sido Etiopía, Burundi y Rwanda, Africa central, sureste de Uganda Nigeria y Argelia, Bolivia, Ecuador y Perú, junto con Estados Unidos (64).

J).- Inmunidad.

La resistencia natural del huésped a la infección debe considerarse en las valoraciones de la virulencia de las rickettsias. Las rickettsias estimulan la inmunidad humoral y celular. El papel de cada una de ellas en respuesta a la infección humana y animal no se conoce por completo. El anticuerpo humoral aparece en respuesta a la infección por rickettsias entre el 7^o y 14^o día de la enfermedad. La persistencia de rickettsias en personas y animales inmunes sin recrudescencia de la enfermedad puede ser resultado de la protección del anticuerpo humoral, pero sin duda este último

no es el único factor en la inmunidad de las rickettsias.

El anticuerpo específico para las Rickettsias aparece al final de la primera semana de la enfermedad en infecciones humanas y animales, y persiste en algunos casos durante años. Rickettsemia y anticuerpo específico circulante son detectables en la misma muestra de sangre durante la enfermedad y la convalescencia. - El ser humano responde pronto a la infección primaria con anticuerpos IgM. Philip y colaboradores en 1976 (101), encontraron anticuerpos IgM por medio de inmunofluorescencia. Los anticuerpos IgM desaparecen a los 3-4 meses. El anticuerpo IgG aparece por lo general en la tercera semana de la enfermedad y persiste uno o más años.

La respuesta de antígenos puede suprimirse con anticuerpos - al comienzo de la enfermedad. Se supone que el tratamiento precoz suprime la producción de anticuerpos reduciendo la masa antigénica.

Existen algunas reacciones antigénicas cruzadas entre grupos donde el grado de reactividad cruzada, refleja no solamente el -- grado de antígenos compartidos sino también la especie del huésped que interviene (16). Estudios seroepidemiológicos que no se han comprendido en gran escala, deben de tomar en consideración -- las reacciones cruzadas que se presentan.

Todas las formas de Tifo confieren inmunidad permanente, pero la condición corresponde a "premunición", o sea inmunidad de infección o inmunidad no estéril ya que las rickettsias permanecen latentes en los microorganismos, lo que explica las recaídas en -- el Tifo Exantemático (Enfermedad de Brill-Zinsser) (71).

La inmunidad es de duración variable. En realidad hay muchas dudas acerca de que se desarrolle, en vista del carácter recurrente de la enfermedad, de la naturaleza periódica del estado del -- portador sanguíneo en algunos individuos y de los datos que se conocen sobre la existencia de infecciones latentes por Rickettsia

quintana (60).

Algunos estudios realizados (64) han demostrado que los macrófagos normales pueden ser activados in vitro por productos solubles de las células T (linfocinas) para transformarse en un agente rickettsial. Los mecanismos in vivo de Rickettsia quintana pueden involucrar la interacción de células T sensibilizadas especialmente con antígenos rickettsiales por la producción de linfocinas que activan macrófagos para convertirse en células efectoras. La inmunidad mediada por células puede ser importante en la resistencia a las rickettsias. La respuesta inmune del hospedero a la infección rickettsial es probable de ser una interacción superficie-superficie con reconocimiento primario de componentes peptídicos de la pared celular de la rickettsia.

La inmunidad mediada por células puede ser un mecanismo importante y útil para la inhibición y erradicación de rickettsias en los tejidos. Pacientes convalescientes de rickettsiosis muestran reacciones de hipersensibilidad tardía al inyectarse antígenos rickettsiales y estas reacciones de hipersensibilidad pueden contribuir a la vasculitis.

K).- Medios de cultivo.

Rickettsia quintana no puede ser cultivada en cobayos, ratón o huevos embrionados. De antemano, el agente etiológico pudo ser recuperado solo por el uso del piojo y del xenodiagnóstico. Ahora se sabe que Rickettsia quintana puede ser propagada con facilidad en agar sangre incubada a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ en aire. El medio básico consiste en base de agar sangre Difco (infusión carne-corazón, triptosa, NaCl y agar), 6% de suero de caballo inactivado a 56°C por 30 minutos, y 4% de eritrocitos de caballo lavados 3 veces con solución salina de fosfatos (buffer de pH 7.2) y hemolizados con agua destilada o por rápido congela-

miento a -60°C y rápido descongelamiento a 37°C (22). Rickettsia quintana ha sido recuperada de sangre fresca heparinizada y de ejemplares previamente colectados y conservados a -60°C . Los organismos estan presentes en la sangre durante el estado agudo de la enfermedad así como en el periodo asintomático. Desde catorce días después de inculada la superficie del medio por entra de 0.05 ml de sangre, diminutas colonias de 65 a 200u de diámetro pueden ser vistas en la superficie con un aumento de 20X. Posteriores subcultivos son efectuados por la emulsificación de colonias en diluyente Sacarosa PG (Solución SPG e Snyder II) a pH de 7. La viabilidad de los microorganismos fué retenida suspendiendo colonias en solución SPG, rápidamente congeladas y conservadas a -60°C (16, 124).

En el medio sólido la hemoglobina cristalina puede ser utilizada en lugar de los eritrocitos lizados y la albúmina bovina (se utiliza como agente detoxificante) puede remplazar el suero (15).

Myers y colaboradores (88) demostraron una necesidad de hématina para el crecimiento; y dedujeron que esta última se requiría como precursor en la síntesis de diversas hemoproteínas. Rickettsia quintana no creció en sustitutos de hématina que satisfacían a otras bacterias con necesidad de hématina (16).

Los eritrocitos contienen un factor o posiblemente factores esenciales para la multiplicación de Rickettsia quintana. Este factor es criostable y termostable, y puede ser hemoglobina (125). El suero es marcadamente estimulatorio pero no absolutamente necesario. Sin embargo, cuando la hemoglobina cristalina humana es substituida por los eritrocitos, el suero es esencial. La función de la hemina, es como catalizador para la destrucción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (87).

Rickettsia quintana es catalasa negativa, y el crecimiento se realiza cuando el succinato y glutamato son adicionados como ruta

de energía (88).

Rickettsia quintana crece fácilmente en base de agar sangre cuando las siguientes condiciones y suplementos son provistos:

- a) atmósfera de 5% de CO₂.
 - b) condiciones aeróbicas.
 - c) hemoglobina cristalina o hemina, pero no protoporfirina.
 - d) un agente destoxificante sólido, tal como almidón o carbo-
- bono.

Vinson y Fuller en 1961 (127) obtuvieron un microorganismo del tipo de Rickettsia quintana partiendo de la sangre de un caso de Fiebre de las Trincheras cultivándolo en gelosa sangre. Este germen pudo después ser propagado en el saco de la yema de huevos embrionada, así como cultivo en células HEF (122).

Un medio líquido que ha sido desarrollado, puede ser utilizado para el subcultivo de cepas aisladas en medio sólido y para preparar antígenos (12, 88). Mason en 1970 (77) demostró que el suero de ternera fetal, pero no el suero de ternera, satisfacía el requerimiento de Rickettsia quintana por el lisado de eritrocitos. Tiene en este medio, una fase de atraso de 24 horas, una fase de crecimiento exponencial de 72 horas y un tiempo de duplicación de 4.5 horas. El factor de crecimiento del suero de ternera fetal fue: a) no dializable; b) resistente al calentamiento a 56°C por 30 minutos y c) parcialmente inactivado a 100°C por 2 minutos e inactivado a 100°C por 10 minutos. Glutamina y glutamato son utilizados como fuente de energía en el Ciclo de Krebs. La glucosa no es catabolizada. En el medio líquido el lisado de eritrocitos es remplazado por el suero de ternera fetal. Este medio se puede enriquecer por la adición de ciertos aminoácidos. La función del extracto de levadura es el de proveer una vía de aminoácidos para el crecimiento. Compuestos hierro-porfirina en el extracto de levadura son esenciales para el crecimiento de Rickettsia ---

quintana.

El medio líquido enfatiza la presencia de factores presentes en eritrocitos y suero diferentes a la hemoglobina que estimula el crecimiento de Rickettsia quintana. La diferencia entre suero de ternera fetal y suero de ternera, es la cantidad de hemoglobina, por lo que el suero de ternera fetal provee el crecimiento -- (16, 77, 88).

El tiempo de generación de Rickettsia quintana es de 33°C y 10 horas en medio sólido, y de 4.5 horas en medio líquido con una temperatura óptima de crecimiento de 35°C (88).

L).- Diagnóstico.

Muchos procedimientos serológicos detectan anticuerpos de -- Rickettsia quintana en el hombre, entre ellos Fijación de Complemento (126), Hemaglutinación Pasiva (30), Inmunoensayo Enzimático y Prueba de Radioinmunoprecipitación (50) y se ha demostrado reacción cruzada con el Tifo de los Maternales (54).

Pruebas de Inmunoensayo Enzimático (IEE) fueron utilizadas para el diagnóstico de Fiebre de las Trincheras y para determinar la reacción cruzada de Rickettsia quintana con otras rickettsias. Los resultados fueron comparados con los obtenidos por Contraínmunolectroforesis (CIE). Todos los sueros de casos de formas primarias o reinicidentes de Fiebre de las Trincheras fueron positivas en IEE, con títulos de anticuerpos en suero de 1:20-1:640 y en CIE dieron de 1-3 líneas de precipitación. Sueros de personas o pacientes con otras infecciones rickettsiales fueron probados. Los resultados muestran que EIA es adecuada para el diagnóstico de Fiebre de las Trincheras y con los resultados obtenidos por CIE sugiere que Rickettsia quintana esta relacionada antigenicamente con Rickettsia tsutsugamushi y posiblemente con rickettsias -- del Grupo Tifus (54).

Una prueba de Hemaglutinación Pasiva desarrollada para el diagnóstico de Fiebre de las Trincheras es fácilmente realizada y altamente sensitiva y específica. Eritrocitos de certero son sensibilizados con antígeno soluble de Rickettsia quintana. La prueba detecta anticuerpos en casos de infección primaria y en casos de Fiebre de las Trincheras tardía. Los títulos de anticuerpos fluctúan de 1:20 a 1:640. No obstante, ambos anticuerpos IgG e IgM para Rickettsia quintana son detectados por esta prueba; las IgG aparecieron por ser los anticuerpos más reactivos. Los antígenos involucrados en la reacción fueron dos proteínas, una inactivada entre 50-80°C y la otra entre 80-100°C. Esta prueba tiene especificidad del 93.3%. Debido a que esta prueba detecta preferentemente IgG, se utiliza para el diagnóstico serológico de infecciones agudas y vigilancia de poblaciones susceptibles (30).

El método serológico más frecuentemente utilizado es la prueba de Fijación de Complemento (FC) con antígenos solubles y particulados. Junto con la reacción de aglutinación permite la diferenciación de enfermedad primaria o secundaria (Enfermedad de Brill-Zinsser). La prueba de FC provee un procedimiento de rápido diagnóstico, que puede ser utilizado en conjunto con el aislamiento de Rickettsia quintana de sangre de pacientes. Antígenos solubles y particulados pueden ser preparados de Rickettsia quintana completamente propagada en agar sangre (17).

La Reacción de Weil-Felix es una prueba no muy útil en rickettsiosis por Fiebre Q y Rickettsia quintana, y tiene además, severas limitaciones.

Rickettsia quintana no ha demostrado producir H_2O_2 , por lo que tiene reacción catalasa negativa (88).

Cohen y colaboradores (26) afirman que el diagnóstico serológico de una enfermedad rickettsial depende de la demostración de un incremento significativo en el título de anticuerpos especí

ficos en el suero durante el curso de la enfermedad y convalecencia. Para efectuar esto, la sangre puede ser colectada tanto en el principio de la enfermedad como en los días 10-14 cuando los anticuerpos están presentes por primera vez y posteriormente en los días 21-28, cuando títulos significativos pueden ser demostrados. Si la terapia intensiva con antibióticos es iniciada dentro de los primeros cinco días de la enfermedad, el desarrollo de los anticuerpos puede ser retardado. En algunas ocasiones puede ser necesaria la obtención de una tercera o cuarta muestra después de 2-3 meses para demostrar un nivel significativo de anticuerpos. La evaluación de la estabilidad de las diferentes clases de inmunoglobulinas de anticuerpos rickettsiales en sangre conservada en discos de papel filtro en estado seco, demuestra que la actividad de los anticuerpos IgG decrece rápidamente, y la actividad de la IgG fué relativamente constante durante un período de 4 meses a -20°C.

Varela y Buentello (122) han demostrado que el diagnóstico clínico se puede hacer en ocasiones tomando en cuenta el tipo recurrente de la fiebre, así como por antecedentes de Pediculosis. Desde luego deben ser excluidos los diagnósticos de Malaria, Fiebre recurrente e Influenza, principalmente. En los casos abortivos o benignos es muy difícil el diagnóstico clínico. El mejor método en este caso para precisar la enfermedad es el Xenodiagnóstico buscando el desarrollo de Rickettsia quintana en piojos limpios (Pediculus humanus) puestos a picar sobre enfermos sospechosos. La Rickettsia quintana aparece en las heces de los piojos, así como en su tubo digestivo alrededor de los 12 días siempre en posición extracelular. Hasta ahora ha sido difícil obtener suficiente cantidad de estas rickettsias.

Varela y colaboradores en 1969 (124), demostraron que la -

infección se puede hacer en voluntarios por escarificación con una suspensión salina de piojos de cuerpo y de sangre infectada - inculada subcutáneamente. La enfermedad en este caso se confirma por xenodiagnóstico. La inoculación de piojos con microorganismos cultivados muestran una fotografía histológica típica con Rickettsias exclusivamente extracelulares en el lumen de su intestino.

El diagnóstico diferencial de la Fiebre de las Trincheras deberá también de tomarse en cuenta el Dengue y fiebres similares, Paludismo y Brucelosis (60).

El aspecto morfológico de los organismos puede ser examinado por la técnica de tinción de Giemsa o Giménez. La identificación es confirmada por la demostración específica por fijación de Complemento con suero hiperinmune de conejo y antígenos preparados de los organismos crecidos en agar o en medio líquido o bien por Inmofluorescencia por el método directo o indirecto. Rickettsia quintana también se puede teñir con azul de toluidina (detecta el BNA), reacción periódica con ácido de Schiff (PAS) o la tinción de Feulgen (detecta BNA). La reacción PAS es positiva así como la tinción de Feulgen para Rickettsia quintana (61).

M).- Tratamiento.

Rickettsia quintana, el agente etiológico de Fiebre de las Trincheras, ha sido probado por el método de dilución en agar para su susceptibilidad a los siguientes 14 antibióticos: Penicilina G, Metecilina, Ampicilina, Cefalotina, Vancomicina, Doxiciclina, Tetraciclina, Eritromicina, Cloramfenicol, Estreptomicina, Kanamicina, Rifampicina, Colistín y Anfotericina B. Rickettsia quintana muestra ser susceptible in vitro a estos antibióticos con excepción de la Vancomicina, Kanamicina, Estreptomicina, Colistín y Anfotericina B (69).

El crecimiento de las rickettsias se inhibe con el Cloramfenicol y las tetraciclinas que constituyen el tratamiento de las enfermedades rickettsiales. Las tetraciclinas se prefieren sobre el Cloramfenicol por el alto riesgo de las reacciones adversas de este último. El tratamiento debe ser prolongado para evitar la aparición de recaídas al retiro del antibiótico.

Una nueva tetraciclina, la Doxiciclina, es mejor absorbida y mas lentamente excretada que otros compuestos de este grupo, ha sido utilizada satisfactoriamente para el tratamiento de Tifo --- transmitido por piojos en áreas endémicas.

Penicilina y Estreptomocina no tienen valor elínico pero inhiben en pequeña cantidad las rickettsias. Los anticuerpos que inhiben el crecimiento no eliminan las rickettsias viables de las personas infectadas. La persistencia de rickettsias en pacientes que sobreviven a un ataque de Tifo en la era preantibiótica se ilustra por la enfermedad recurrente. En animales de laboratorio que sobreviven a una infección rickettsial la recurrencia de la enfermedad puede provocarse por la administración de Cortisona, pues se presume que la Cortisona en los animales imita el stress humano, que parece modificar la relación huésped-parásito, permitiendo la proliferación de las rickettsias. La persistencia de rickettsias viables después de cierto tratamiento, indica que estas drogas son rickettsiostáticas. Cepas de rickettsias resistentes a los antibióticos no se han aislado en la naturaleza.

En la época actual cuando disponemos de antimicrobianos muy activos es fácil olvidar la patología del Tifo y descuidar la atención a otros síntomas como:

- a) el estado de choque, la hipoproteinemia, los edemas y sobre todo la coagulopatía. Las indicaciones para esto son: infusiones de albúmina y heparina; la sangre total y el plasma están contraindicados por el peligro de coagulación

intravascular diseminada.

- b) la cefalea debe aliviarse con sedantes y analgésicos.
- c) La hipertérmia debe controlarse por medios físicos.
- d) la miocarditis grave debe manejarse con Digital y Oxígeno.
- e) el uso de cavidades y cambio de posiciones puede ayudar a evitar infecciones agregadas (71).

La quimioprofilaxis requiere igual o mayor atención que la -
Quimioterapia con observación de la dosis y duración del trata-
miento para obtener una supresión de síntomas evidentes y el desa-
rrollo de una protección activa. La profilaxis de la Fiebre de las
Trincheras estriba sobre todo en la aplicación de medidas eficaces
contra el piojo (60).

5).- Eficacia de los métodos disponibles para la detección de Tifo.

En la Tabla III se ilustran las ventajas y desventajas de ca-
da técnica según Lennette (73).

Identificación de Rickettsias en el laboratorio.

A).- Aislamiento de la Rickettsia.

La rickettsemia ocurre en los humanos durante el período febril de la enfermedad. La sangre colectada en el curso de la enfermedad antes de la administración de antibióticos es el material más adecuado para el intento de aislamiento. Cuando la muestra es obtenida durante la primera semana de la enfermedad, la sangre -- completa heparinizada o defibrinada puede ser utilizada para el aislamiento. Alternativamente la sangre es colectada y se deja -- coagular. Después de la centrifugación, el suero es removido y con servado para pruebas serológicas.

El coágulo es triturado, y una suspensión del 20-50% prepara da en diluyente Snyder II compuesto de sacarosa y glutamato en un buffer de fosfato de potasio a pH 7; o en caldo infusión cerebro-corazón, es inoculado dentro de hospederos adecuados de laborato rio o en un sistema de cultivo celular. Las probabilidades de re- cubrir el agente de la sangre completa colectada después de la - primera semana de la enfermedad es mucho muy reducida, y el coágu lo puede ser utilizado para intento de aislamiento. La separación del suero del coágulo remueve anticuerpos inhibidores que pueden estar presentes. Si transcurre más de una hora, entre el tiempo - en que la sangre es colectada y la inoculación puede ser efectua da, el coágulo y el suero después de la separación, pueden ser -- congelados rápidamente en un baño de hielo seco-alcohol y conser vados en hielo seco o nitrógeno líquido hasta ser procesados. Las muestras congeladas son rápidamente descongeladas en un baño de - agua a 37°C, rápidamente procesadas e inoculadas. Una muestra del inóculo es conservada a una temperatura de -65°C o menores si se

requieren estudios adicionales al aislamiento. Todos los dilu--
tes son enfriados a 4^oC antes de utilizarse y todas las suspensio--
nes son conservadas en hielo.

En ocasiones es necesario el intento de aislamiento en teji--
dos obtenidos de la autopsia. Se recomienda 1 o 2 cm³ de cada uno
de los órganos viscerales y el cerebro puede ser obtenido aseptica-
mente, colocados individualmente en contenedores adecuados estéri-
les con tapón de rosca y congelados rápidamente como fué descrito
anteriormente. Los tejidos son altamente contaminantes. Los teji--
dos se procesan individualmente, o cantidades iguales son combina--
das e inoculadas como un pool. Una suspensión del tejido al 20%
es preparada en el diluyente Snyder II o en caldo infusión cerebro
corazón. Si se sospecha de contaminación bacteriana, antes de la
inoculación, una porción es tratada por 30 minutos en incubación
con 100-1000 unidades de Penicilina por mililitro de inóculo y de
pendiendo del tipo de hospedero de laboratorio, se puede utilizar
100-500 ug de Estreptomocina. Penicilina y Estreptomocina pueden
ser utilizados para preparar el material para inoculación de rato--
nes y huevos embrionados pero no para inoculación de cultivo celu--
lar o cobayos. Esta concentración de antibióticos inhibe el creci--
miento de la mayoría de las rickettsias en cultivos celulares y -
La citada concentración de Estreptomocina es tóxica para el cova--
yo. Los antibióticos de amplio espectro, Cloramfenicol y Tetraci--
clina, no pueden ser utilizados para suprimir a las bacterias por
su efecto rickettsiostático. El Sulfato de Gentamicina puede ser
inhibitorio para las rickettsias a una concentración de 50 ug/ml.
(134).

El aislamiento primario de rickettsias en animales de labora--
torio puede lograrse por ciertos hospederos. Esto se puede obser--
var en la Tabla IV.

El aislamiento de rickettsias debe intentarse en general solo

TABLA IV. AISLAMIENTO PRIMARIO DE RICKETTSIAS EN ANIMALES DE LABORATORIO.

AGENTE ETIOLOGICO	HOSPEDERO PREFERIDO	PERIODO DE INCUBACION (DIAS)	MANIFESTACIONES CLINICAS	MORTALIDAD ESPERADA	TEJIDOS CONSERVADOS PARA PASE
<u>Rickettsia</u> <u>crowleyaeii</u>	Cobayo macho	5-12	Fiebre	Ninguna	Bazo o Cerebro
<u>Rickettsia</u> <u>typhi</u>	Cobayo macho	3-10	Fiebre, edema escrotal y eritema	Ninguna	Bazo Túnica
<u>Rickettsia</u> <u>rickettsii</u>	Cobayo macho	3-10	Fiebre, edema escrotal, eritema, hemorragia y necrosis	Frecuente	Bazo Sangre Túnica
<u>Rickettsia</u> <u>conorii</u>	Cobayo macho	3-6	Fiebre, edema escrotal y eritema	Rara	Bazo Túnica
<u>Rickettsia</u> <u>australis</u>	Cobayo macho	4-5	Fiebre, edema escrotal y eritema	Ninguna	Bazo Túnica
<u>Rickettsia</u> <u>sibirica</u>	Cobayo macho	5-10	Fiebre, edema escrotal y eritema	Ninguna	Bazo Túnica
	Ratón blanco adulto	6-9	Inactividad, piel áspera	Común	Bazo
<u>Rickettsia</u> <u>akari</u>	Cobayo macho	3-7	Fiebre, edema escrotal y eritema	Rara	Bazo Túnica
<u>Rickettsia</u> <u>tsutsugamushi</u>	Ratón blanco	6-18	Inactividad, piel áspera, ascitis	Común	Bazo
<u>Coxiella</u> <u>burnetii</u>	Cobayo macho	5-12	Fiebre	Rara	Bazo

en un laboratorio de investigación (16).

B).- Cultivo de Rickettsias en Huevo Embrionado.

Ocasionalmente las cepas o especies de rickettsias no pueden ser identificadas por su reducida virulencia en animales de laboratorio, o porque los procedimientos serológicos proveen resultados diferentes a los esperados. La adaptación del agente al cultivo en huevos embrionados de gallina es necesaria para realizar -- comparaciones inmunológicas y serológicas directas de las rickettsias. Este procedimiento es comúnmente difícil y tedioso debido a que es necesaria una técnica estrictamente aséptica. Suspensiones bacteriológicas estériles de bazo, sangre y túnica vaginal de cobayos infectados, o suspensiones de bazo de ratón infectado, o -- bien suspensiones de cultivo celular infectado son inoculadas en el saco vitelino de huevo de gallina embrionado de 5-7 días. La adaptación de las rickettsias se observa por un crecimiento lujurioso que ocurre después de unos cuantos pases, pero en ocasiones se requiere de varios meses de trabajo intensivo (73, 131).

Otros estudios (16) indican que las rickettsias pueden aislarse por inoculación en el saco vitelino de huevos de gallina embrionados, pero que la adaptación a estos sustratos es a menudo -- lenta, y los inóculos pequeños pueden perderse.

C).- Animales de Laboratorio.

Para el aislamiento primario de rickettsias en animales de -- laboratorio, se recomienda seguir la metodología presentada en la Tabla IV.

Los animales de laboratorio son inoculados con una suspensión preparada por trituración de artrópodos vivos o tejidos frescos -- conservados en diluyente Snyder II o caldo infusión cerebro-corazón.

Si los especímenes son congelados, el material es descongelado rápidamente, inmediatamente antes de ser procesado. Las partículas grandes son removidas por centrifugación (100-400xg) y el sobrenadante es inoculado.

Cuando los animales son utilizados para estudios de aislamiento es necesario tratar a los artrópodos antes de triturarlos para reducir el número de bacterias contaminantes en su superficie exterior. Muchos artrópodos tienen una flora intestinal normal difícil de eliminar sin destruir las rickettsias que pueden estar presentes. Ratones y cobayos toleran cantidades moderadas de contaminantes bacterianos cuando se inoculan intraperitonealmente. Comúnmente los artrópodos son colocados en una solución 1:1000 de merthiolate cerca de una hora en un cuarto de temperatura. Posteriormente los artrópodos son lavados varias veces en agua destilada estéril o solución salina estéril. Penicilina (100-1000 u/ml), o en combinación con dehidroestreptomicina (100-500 ug/ml), pueden ser adicionados en el lavado así como en los diluentes utilizados para preparar la solución o suspensión (73).

El aislamiento se logra preferentemente por inoculación intraperitoneal inmediata, no más de una hora después de la recolección de la muestra, en animales de laboratorio o experimentación apropiados. Varios pasajes de tejidos de animales inoculados a intervalos aproximadamente de 14 días pueden ser necesarios para que se desarrolle una infección sintomática. En el cobayo la única indicación puede ser un aumento de la temperatura rectal que se registra diariamente desde el momento de la inoculación. En el primer pasaje de rickettsias no hay fiebre, sino hasta la tercera semana después de la inoculación, esto generalmente. El cerebro o el bazo deben cosecharse en el animal febril e inocularse intraperitonealmente a otros cobayos. Si no hay fiebre ni otra evidencia de infección, animales en segundo o tercer pasaje se san-

gran al 28° día para estudio de anticuerpos. El anticuerpo en este caso puede ser la única evidencia de que se aislaron rickettsias.

Si el inóculo de rickettsias es grande, el escroto puede agrandarse y los testículos pueden adherirse a la bolsa escrotal. Esto se conoce como reacción de Neill-Mooser. Este tipo de reacción depende del tipo de rickettsia del que se trate. Las rickettsias aisladas se identifican usándolas como antígeno en la Prueba de Fijación de Complemento o en otras pruebas serológicas contra diversos antisueros, y por vacunación cruzada y desafío contra rickettsias conocidas. También se puede presentar gangrena de las orejas y almohadillas plantares (16).

D).- Diagnóstico Serológico.

El diagnóstico de la etiología de las enfermedades rickettsiales puede ser efectuado fácil y rápidamente por la demostración de un incremento significativo de los anticuerpos específicos en el suero de los pacientes durante el curso de la infección y convalecencia. Actualmente, debido a la pequeña demanda de productos necesarios o requeridos para dicho diagnóstico, solo el material para la prueba de Weil-Felix y ciertos antígenos para Fijación de Complemento pueden ser obtenidos comercialmente.

Las pruebas más comunes para el diagnóstico de la etiología de las enfermedades rickettsiales son las siguientes.

Reacción de Weil-Felix

Las rickettsias comparten antígenos con otras bacterias. Los antígenos compartidos con microorganismos Proteus son la base de la prueba de aglutinación de Weil-Felix. En infecciones rickettsiales la reacción de Weil-Felix depende del desarrollo de anticuerpos que aglutinan ciertas cepas inmóviles de Proteus. En algu

TABLA V. REACCION DE WEIL-FELIX.

ENFERMEDAD	RICKETTSIAL	MAGNITUD DE RESPUESTA DEL ANTICUERPO		
		ANTIGENOS DE PROTEUS		
		OX ₁₉	OX ₂	OXK
TIFO EPIDEMICO (PRIMARIO)		++++	+	0
TIFO MURINO		++++	+	0
FIEBRE MANCHADA DE LAS MONTAÑAS ROCASAS		++++	+	0
OTRAS INFECCIONES TRANSMITIDAS POR GARRAPATA		+	++++	0
RICKETTSIALPOX		0	0	0
TIFO DE LOS MATORRALES		0	0	+++
FIEBRE Q		0	0	0
FIEBRE DE LAS TRINCHERAS		0	0	0

En escala de + a ++++ donde + indica bajo grado de respuesta y ++++ indica un alto grado de respuesta. Para estudios epidemiológicos a gran escala considerese eficacia a ++++.

nas ocasiones los antígenos reaccionan inespecíficamente dando resultados falso-positivos; por ejemplo en pacientes con infección del tracto urinario por Proteus, Leptospirosis, infección con Brucella y enfermedades severas del hígado debido a una variedad de causas. Se obtienen dos muestras de suero en el inicio de la enfermedad y una en la convalescencia. La prueba se considera positiva cuando el título de anticuerpos en la segunda muestra es 4 - diluciones mayor que la primera muestra. Las reacciones clásicas que se obtienen se dan en la Tabla V (73).

Como estos antígenos tienen venta comercial y los procedimientos son simples, los médicos han utilizado esta prueba para el diagnóstico de enfermedades rickettsiales. Hecshemy y colaboradores (49) demostraron en 1979 que esta prueba no es segura por que las aglutininas faltan a menudo en la enfermedad confirmada por rickettsias; además, como ya se mencionó, la presencia de aglutininas puede indicar únicamente infección por Proteus u otras bacterias.

Otros autores (118) indican que el diagnóstico diferencial solo puede establecerse después de practicar una serie de pruebas a intervalos de 5 a 7 días utilizando tres antígenos Proteus diferentes: OX 19, OX 2 y OXK.

Fijación de Complemento.

Los anticuerpos rickettsiales humanos son detectables por medio de muchos procedimientos serológicos. Una gran variedad de antígenos fijadores de complemento han sido preparados por varios métodos que requieren de extracciones con éter. Independientemente del método de preparación o del origen comercial, los antígenos - solubles fijadores de complemento pueden variar considerablemente con respecto a la especificidad de grupos y especies. La prueba -

de Fijación de Complemento puede hacerse especie específica cuando suspensiones de rickettsias lavadas como antígeno (16, 118).

La prueba de Fijación de Complemento no es un procedimiento sencillo aplicable a todas las rickettsias, y los métodos utilizados no dan preparaciones satisfactoriamente uniformes. Antígenos rickettsiales específicos de grupo, tipo y especie, han sido obtenidos con rickettsias en el Grupo Tifo, Fiebre Manchada y Tifo de los Matorrales y con Coxiella burnetii por una centrifugación diferencial suplementada con extracción con éter (73,103), adsorción con Celite (143), resinas de intercambio iónico (amberlita) (149), resinas de intercambio aniónico (38), precipitación - con albúmina sérica bovina (11), uso de solución salina hipertónica (107), resinas de intercambio aniónico en columnas cromatográficas (59); y han provisto suspensiones rickettsiales altamente purificadas que se han utilizado en estudios de composición antigénica, inmunogenicidad y actividad metabólica.

La prueba de Fijación de Complemento ha sido utilizada ampliamente para la detección serológica de la infección en animales domésticos y salvajes, en humanos, así como para estudios ecológicos. Como los anticuerpos fijadores de complemento no se encuentran sino hasta la tercera semana de la enfermedad se han hecho - muchos esfuerzos para lograr procedimientos aptos para el diagnóstico precoz (16).

Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes.

La tinción indirecta de Anticuerpos Fluorescentes empleando muestras de rickettsias como antígeno puede ser utilizada para el diagnóstico serológico de infecciones rickettsiales en humano como lo han demostrado Elisber y Bozeman (35). Sin embargo las reacciones positivas de anticuerpos fluorescentes identifican solo el

grupo antigénico al que corresponde el agente causal pero no la especie rickettsial. Infecciones por Tifo Epidémico y Murino han sido diferenciadas por la Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes por métodos de absorción de anticuerpos utilizando antígenos solubles (46).

Esta prueba es una técnica de inmunofluorescencia combinada en la que se sigue un proceso de reacción que consta de dos etapas. En la primera etapa, un antígeno determinado se recubre con diluciones de suero humano, después de lo cual se incuban las placas, se lavan y se dejan secar. En la segunda etapa se recubre el antígeno con fluoresceína rotulada como suero contra la globulina humana. De esta forma, los sueros positivos no rotulados confieren fluoresceína o fluorescencia a los anticuerpos (118).

Microinmunofluorescencia Indirecta.

Boceman y Eliaberg (13) afirman que esta técnica se ha empleado cada vez más para el diagnóstico serológico. Una suspensión concentrada de rickettsias de sacos vitelinos infectados o de cultivo celular se usan como antígeno. En la microtécnica muchos spots de antígeno pueden aplicarse en un solo portaobjetos. Después de secar al aire y fijar con acetona, las láminas pueden conservarse a -70°C para su uso posterior (16). Recientemente la prueba de Microinmunofluorescencia ha mostrado ser un método altamente específico y sensitivo para el diagnóstico serológico, así como para estudios epidemiológicos (95, 101, 102). De este modo, como en el diagnóstico serológico de otras enfermedades rickettsiales, es posible demostrar el incremento significativo de anticuerpos cuando la primera muestra es obtenida al final de la primera semana y la segunda muestra al final de la segunda semana. Esta prueba detecta anticuerpos en el sexto y séptimo día de la enfermedad (16).

Prueba de Aglutinación.

-Con suspensiones rickettsiales altamente purificadas utilizadas como antígeno, la Prueba de Aglutinación ha sido empleada para el diagnóstico de Tifo Epidémico y Murino. Si el paciente ha sido vacunado previamente contra el Tifo Epidémico, la Prueba de Aglutinación es muchas veces simplemente un procedimiento serológico que diferencia infecciones por Tifo Murino y Epidémico. Esta prueba también ha sido empleada para la detección de infecciones pasadas y presentes en humanos y animales domésticos y salvajes, así como para la investigación de la respuesta de anticuerpos posterior a la vacunación (21). Debido a que los antígenos son difíciles de preparar y no pueden ser obtenidos comercialmente, la Prueba de Aglutinación rickettsial no ha sido adoptada rutinariamente para el diagnóstico serológico en los laboratorios clínicos. (16).

Prueba de Microaglutinación.

Un método más sensitivo para detectar anticuerpos rickettsiales (21,39) es la prueba de Macroaglutinación en placa. En esta prueba la aparición de la aglutinación después de la incubación es evaluada por examinación microscópica de una mezcla diluida suero antígeno en la placa, después de que ha sido secada y teñida. La Prueba de Microaglutinación para detectar anticuerpos contra Tifo es un método muy seguro y es una prueba más sensitiva que la de Fijación de Complemento (37) en la diferenciación entre Tifo Murino y Tifo Epidémico (17). La Prueba de Aglutinación en tubo capilar (75) es de uso limitado para examinación de sueros humanos. Recientemente la técnica de Microtitulación ha sido adaptada para utilizarse en la Prueba de Microaglutinación para Fiebre Q y Tifo Epidémico y Murino (37, 95), y Fiebre Manchada de las

Montañas Rocosas (102). La Prueba de Microaglutinación es más -
sensible que la de Fijación de Complemento y un poco menor que -
la de Microimmunofluorescencia. Las aglutinaciones rickettsiales
generalmente son detectadas claramente en el curso de la enferme-
dad y persisten durante el período de convalecencia. En el Tifo
Epidémico (85), la microaglutinación demostrada del día 11 al -
53 fué identificada como Inmunoglobulina M (IgM). Similarmente en
el Tifo Murino la actividad aglutinante fué asociada con alguna -
clase de Inmunoglobulina (36). La Enfermedad de Brill-Zinsser
presenta una aglutinación rickettsial identificada como Inmunoglo-
bulina M (IgM) (85).

Prueba de Ensayo Inmunoenzimático.

(E.L.I.S.A)

La Prueba de E.L.I.S.A (del inglés " Enzyme Linked Immuno-
sorbent Assay ") es el último procedimiento serológico reportado
para el diagnóstico de enfermedades rickettsiales. La Prueba de -
E.L.I.S.A utiliza antígenos solubles específicos de grupo prepara-
do de Rickettsia prowazekii y Rickettsia typhi (47). Los títu-
los de E.L.I.S.A son altos por 1 o 2 órdenes de magnitud y algu-
nas veces más específicas de tipo que los obtenidos por Fijación -
de Complemento con algún antígeno soluble. La aplicabilidad del -
ensayo para la detección de anticuerpos inducidos por otras espe-
cies de rickettsias y su utilidad en el diagnóstico serológico de
la enfermedad humana aún no ha sido establecido. En general la --
Prueba de E.L.I.S.A no ha sido utilizada extensamente para el diag-
nóstico de la enfermedad, pero ha sido de gran valor en la inves-
tigación básica (17, 73). Esta prueba detecta anticuerpos en el
sexto y séptimo día de la enfermedad (16).

Prueba de Neutralización de Toxinas.

Aunque los anticuerpos específicos de algunas especies y cepas de rickettsias que neutralizan su efecto tóxico aparecen en el suero de los pacientes durante la segunda semana después de la infección y que pueden persistir por años, la Prueba de Neutralización de Toxinas no ha sido utilizada como un procedimiento diagnóstico debido a las dificultades técnicas que presenta. La neutralización inespecífica del efecto tóxico de suspensiones rickettsiales es debida a un componente B-lipoproteico presente en el suero de alguna gente y monos. La prueba ha sido utilizada principalmente en la identificación y clasificación de cepas rickettsiales del Grupo Tifo y Fiebre Manchada y en la evaluación de la potencia y efectividad de las vacunas del Tifo Epidémico. Se ha utilizado con menor frecuencia como una herramienta seroepidemiológica (17, 73).

Prueba de Neutralización.

Esta prueba en que los anticuerpos son adicionados a una suspensión de organismos y la mezcla es inoculada en animales susceptibles, generalmente no ha dado resultados claros con rickettsias como los que se han obtenido con ciertos agentes virales. Este procedimiento ha sido utilizado como una forma extremada sensible para el diagnóstico serológico de infección evidente por Fiebre Q en examen epidemiológico (1) y para caracterización antigénica de cepas del Grupo de la Fiebre de los Matorrales (73). El cultivo de tejidos no ha sido utilizado para la reducción de placas u otros tipos de Pruebas de Neutralización. Experiencias recientes indican que la técnica puede ser adecuada para propósitos de diagnóstico (7, 27).

Prueba de Hemaglutinación Indirecta.

Eritrocitos del grupo O humano sin tratar y eritrocitos de -
carrero sensibilizados con una substancia sensibilizante de eri-
trocitos (ESS) obtenida por calentamiento y un tratamiento alcali-
no de rickettsias del Grupo Tifo y Fiebre Manchada son aglutina-
dos por anticuerpos presentes en el suero de pacientes convaless-
cientes de la enfermedad correspondiente (24,25). Algunos auto-
res (16, 36) han demostrado que los anticuerpos son detectados
inicialmente durante la segunda semana de la enfermedad, y alcan-
zan su punto máximo durante la tercer semana y desaparecen en 3 o
6 meses. Aunque la prueba fué considerada como más sensible, eco-
nómica, sencilla y tan confiable como la de Fijación de Complemen-
to, el procedimiento no ha sido utilizado como herramienta de diag-
nóstico. En el Tifo Murino la aglutinación de la substancia sensi-
bilizante de eritrocitos (ESS) es asociada con las Inmunoglobuli-
nas G (IgG). Esta prueba detecta anticuerpos en el sexto o sépti-
mo día de la enfermedad (17).

Otras pruebas pueden utilizarse para propósitos especiales -
tales como la Prueba de Reacción Cruzada (con rickettsias vivas o
muertas para inmunización), y la Prueba de Formación de Placas --
por Rickettsias en algunos tipos de cultivo de tejidos que pueden
guiar a la elaboración de métodos más precisos para la titulación
de rickettsias y su diferenciación (17).

La substancia sensibilizadora de eritrocitos (ESS) hace a --
los eritrocitos aglutinables por anticuerpos de Tifo. La ESS aparta
se por ser un componente serológico común de las rickettsias del
Tifo Murino y Epidémico. Los anticuerpos en antisueros de Tifo --
son responsables de la aglutinación de los eritrocitos tratados --
con ESS y es diferente de los anticuerpos que aglutinan Proteus.

X 19, rickettsias del Grupo Tifo o fijadoras de complemento en la presencia de antígenos específicos del Grupo Tifo (25).

E).- Cultivo de Tejidos.

Algunas especies de rickettsias han sido propagadas en varias líneas celulares primarias y continuas derivadas de tejidos mamíferos, aviáres y de insectos. En un principio los procedimientos fueron rudos, y la cuantificación de rickettsias fué subjetiva. Posteriormente, cuando la tecnología de cultivo celular llegó a ser mas refinada y las líneas celulares continuas fueron importantes herramientas en el laboratorio, la cuantificación y examinación secuencial de las poblaciones de células infectadas con rickettsias llegó a ser posible (14, 27, 56, 57, 70, 109). En años recientes, la aplicación de los sistemas de cultivo de tejidos mejoró para el estudio de investigación de las rickettsias obteniéndose avances significativos, pero el valor real de esta tecnología para el diagnóstico de laboratorio de rutina aún no está totalmente comprobado. El desarrollo del sistema de ensayo en placa permite la enumeración de rickettsias en suspensiones inoculadas, estudios del efecto del medio y diluentes, determinación en la sensibilidad a los antibióticos y purificación de cepas para clonación - (69, 79, 80, 94, 130, 136, 137). El sistema de ensayo en placa -- también ha sido utilizado para el aislamiento de rickettsias de sangre y tejidos de cobayos infectados (84, 135) y monos (34, 104). Las células primarias de embrión de pollo han sido las más utilizadas para el ensayo en placa, pero las líneas celulares Vero (32), WI-38, DBS-FRHL-2, HeLa (96), L-929 (93, 96) y las de mosquito Aedes albopictus (31, 150) han sido utilizadas en estudios de cepas de rickettsia.

Las rickettsias solo se multiplican en células con actividad

metabolizante o en el citoplasma viable de células enucleadas en un porcentaje relativamente bajo, incrementándose cerca de tres veces en 24 horas (14,115,145); esto es cuando el aislamiento primario de rickettsias es ensayado por inóculo conteniendo relativamente pocos organismos. La susceptibilidad de la mayoría de las rickettsias a la Penicilina, Estreptomocina y otros antibióticos (147), excluye la posibilidad de utilizar el uso de antimicrobianos en el medio para controlar la contaminación bacteriana.

El Cultivo de Tejidos ha sido utilizado infrecuentemente en el cultivo de rickettsias para la preparación de antígenos para pruebas serológicas (6, 112), y los intentos para demostrar la neutralización in vitro con antisuero ha sido insatisfactoria (7, 112). Los cultivos de una variedad de tipos de células utilizadas para el estudio del ciclo de infección de varias especies de rickettsias, producen bastante información en la penetración, cinética de crecimiento (4,14,27,68,109,139,145,146), incluyendo la influencia de cepas virulentas, anticuerpos y otros factores relacionados con la inmunidad humoral y celular en la suerte o destino de los rickettsias en las células infectadas (8, 9, 42, 43, 52, 63, 66, 67, 138, 140, 141, 142, 144).

Cultivos infectados proveen potentes antígenos rickettsiales fijadores de complemento. La facilidad con que antígenos específicos pueden ser preparados en cultivo de tejidos ofrece ventajas sobre el método estándar de preparación de antígenos rickettsiales fijadores de complemento de saco vitelino infectado, que presenta el problema de una reacción fijadora de complemento inespecífica debido a la presencia de antígeno del huevo residual (1).

F).- Examinación Directa de Muestras.

La concentración de rickettsias en la sangre de los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad es relativamente baja, y -

esto es virtualmente imposible para identificar los microorganismos con cualquier grado de certeza en leucocitos o monocitos en frotis tejido de sangre con anilina estándar o técnicas de inmuno fluorescencia. Aunque la técnica de Anticuerpos Fluorescentes ha sido utilizada satisfactoriamente para demostrar organismos rickettsiales en tejidos de animales infectados experimentalmente durante los estados iniciales de la enfermedad (98), esto ha sido en vano para el examen del macerado del bazo u otros tejidos de animales salvajes sospechosos de ser hospederos vertebrados. Cuando las preparaciones de tejido de varios artrópodos no infectados son teñidos con anilina las estructuras descubiertas son morfológicamente indistinguibles de las rickettsias patógenas. La Técnica Directa de Anticuerpos Fluorescentes ha sido utilizada para la identificación de rickettsias en garrapatas infectadas natural y experimentalmente (*Dermacentor andersoni*) (18, 111), y en el pijo del cuerpo (29). Un método altamente reproducible para el conteo de rickettsias ha sido utilizado en la cuantificación del contenido de organismos en suspensiones y vacunas experimentales (113).

G).- Examinación Microscópica.

Para la autopsia de animales de laboratorio enfermos, frotis de tejidos son preparados por una pequeñísima muestra del bazo de ratón o cobayo, túnica vaginal de cobayo o peritoneo parietal del ratón, para lograr un buen frotis. Las placas vistas en cultivo de células de embrión de pollo pueden ser aspiradas y colocadas en placas de vidrio. Varias placas con muestras de cada tejido deben de ser preparadas. La técnica de Tinción de Machiavello o Giménez (44) es mas preferida que la de Giemsa, donde las rickettsias se observan de un color rojo en un fondo verde. Para la tinción de inmunofluorescencia, las placas son fijadas en acetona en

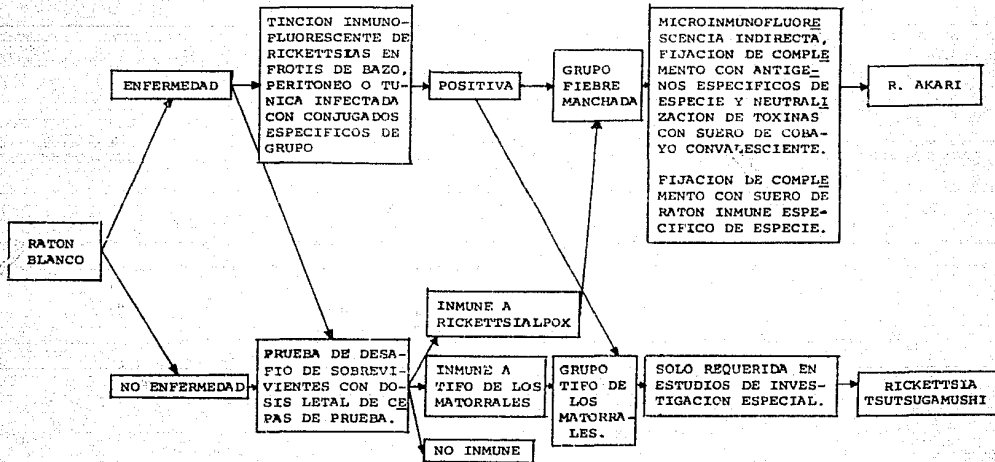
un cuarto de temperatura durante 10 minutos. Si no son procesadas las placas el mismo día, dichas placas deben ser conservadas en congelación a -20°C o temperaturas menores.

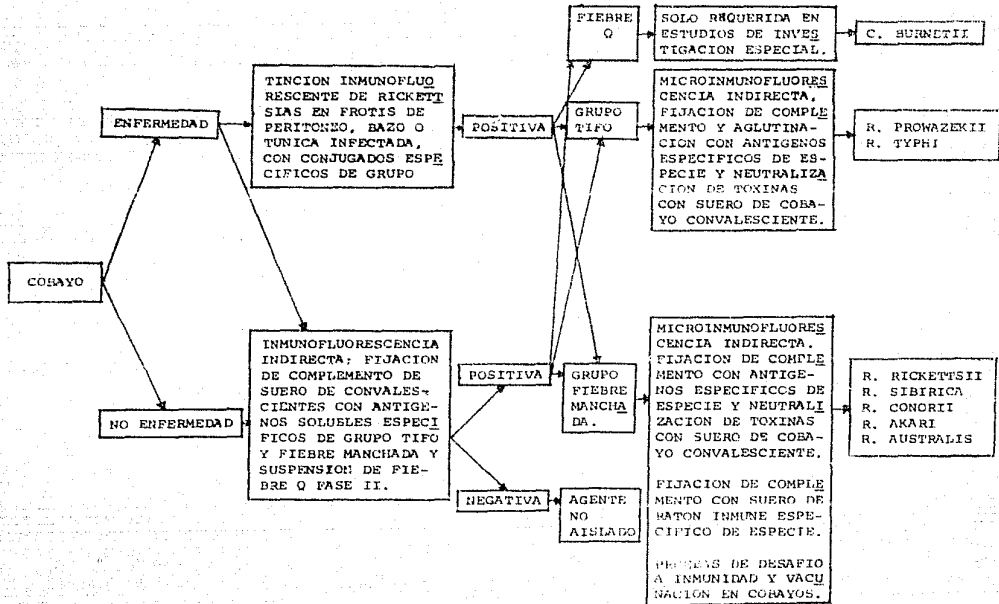
La técnica de Giménez es superior al procedimiento estándar de Machiavello pero ningún método es completamente selectivo para las rickettsias, pues ciertas bacterias pueden retener el color rojo. La diferenciación entre rickettsias y bacterias puede ser hecha en base a su morfología y técnica de cultivo. Toda suspensión preparada durante el curso de estudios rickettsiales debe ser cultivada rutinariamente para detectar contaminación bacteriana por inoculación de placas de agar sangre y tubos de caldo tioglicolato.

Las rickettsias son comunmente escasas en frotis de tejidos del primer pase en animales, y son requeridos pases adicionales para que los organismos sean reconocidos con certeza.

Cuando un número suficiente de rickettsias es encontrado en frotis teñidos, la técnica de Inmunofluorescencia puede ser utilizada para identificar a los organismos. Un diagrama esquemático de procedimientos para el aislamiento e identificación de rickettsias conocidas por infectar al humano, se presenta a continuación.

D I A G R A M A I
 DIAGRAMA ESQUEMATICO DE PROCEDIMIENTOS PARA AISLAMIENTO
 E IDENTIFICACION DE RICKETTSIAS CONOCIDAS POR INFECTAR AL HUMANO.





MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

I.- Vidrio.

- Cajas de Koplín.
- Cajas de Petri.
- Cubreobjetos de 5.5 cm X 2.6 cm.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml, 500 ml y 1000 ml.
- Matraz Volumétrico de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml.
- Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml, y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Portaobjetos de 12 fosas con teflón de 7.5 cm X 2.6 cm para Microinmunofluorescencia.
- Termómetro rectal.
- Tubos de ensaye de 12 X 75 mm y de 13 X 100 mm.
- Tubos de ensaye de 16 X 150 mm con tapón de rosca.
- Vaso de precipitados de 50 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml.
- Viales.

II.- Equipo

- Agitador magnético.
- Balanza analítica.
- Baño maría.
- Cámara oscura.
- Campana de aspiración (flujo laminar).
- Centrífuga refrigerante.
- Gradillas.
- Incubadoras o Estufas de Incubación.

- Jarra de anaerobiosis Gas-Peck.
- Micropipeta manual de 5-250 ul.
- Microscopio de Fluorescencia.
- Microscopio Invertido.
- Microscopio Optico.
- Morteros con pistilo.
- Perilla automática.
- Potenciómetro.
- Puntas de micropipeta de 5-250 ul.
- Refrigeradores con temperatura de 4°C y de -70°C .
- Tabla de disección.
- Tapones de hule.

III.- Soluciones.

- Acetona grado químico reactivo.
- Agua desionizada, agua destilada y agua bidestilada.
- Alcohol al 70%.
- Indicadores de anaerobiosis y generadores de anaerobiosis.
- Merthiolate.
- Solución Salina Fisiológica o Solución Buffer de Fosfatos con pH 7.0 conteniendo 100 u/ml de Penicilina.

a) Solución de Sacarosa Fosfato Glutamato (SPG) o Solución Snyder II.

- Sacarosa 0.218 M (74.62 g).
- KH_2PO_4 0.00376 M (0.51 g).
- K_2HPO_4 0.0071 M (1.23 g).
- Glutamato de Potasio 0.0049 M (0.9 g).

Ajustar la solución a pH 7 con NaOH 10 N.

b) Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (PBS) pH 7.6
0.01 M.

- 1) Solución de Reserva Concentrada 10 X (el pH no sera de 7.6, y la solución se disuelve a 37⁰C).
- Na₂HPO₄ anhidro, grado químico reactivo 12.36 g.
 - NaH₂PO₄·H₂O, grado químico reactivo 1.8 g.
 - Cloruro de Sodio 85 g.
 - Agua destilada c.b.p 100 ml.
- 2) Solución de Trabajo.
- Solución de PBS de reserva 10 X 100 ml.
 - Agua destilada c.b.p 1000 ml.

El pH aproximado es de 7.6.

c) Glicerol de Montaje pH 9.0.

- Glicerol grado químico reactivo 90 ml.
- Na₂HPO₄ 0.2 M 10 ml.

IV.- Colorantes.

a) Colorante de Giménez.

1) Solución Stock de Fuchina Básica Fenolada.

- Solución al 10% de fuchina básica en etanol al 95% 100 ml.
- Solución acuosa de fenol al 4% 250 ml.
- Agua destilada 650 ml.

Esta solución se conserva a 37⁰ C por 48 horas antes de ser utilizada.

2) Buffer de Fosfato de Sodio 0.1 M.

- Na₂HPO₄ 0.2 M 15.5 ml.
- NaH₂PO₄ 0.2 M 3.5 ml.
- Agua destilada 19 ml.

- 3) Solución de Trabajo de Fuchina Básica Fenolada.
 - Solución stock (solución 1) 4 ml.
 - Solución buffer pH 7.45 (solución 2) 10 ml.Esta solución se filtra antes de cada tinción.
- 4) Verde de Malaquita (colorante de contraste básico que tiene poca afinidad por las rickettsias).
 - Oxalato de verde de malaquita 0.8 g.
 - Agua destilada c.b.p 100 ml.

b) Colorante de Machievallis.

- 1) Solución Stock de Fuchina Básica al 5% en Alcohol.
 - Fuchina 5 g.
 - Alcohol etílico al 95% c.b.p 100 ml.
- 2) Solución de Trabajo de Fuchina Básica 0.25%.
 - Solución stock 5 ml.
 - Agua destilada c.b.p 100 ml.
- 3) Acido Cítrico.
 - Acido cítrico 0.25 g.
 - Agua destilada c.b.p 100 ml.
- 4) Azul de Metileno.
 - Azul de metileno 1 g.
 - Agua destilada c.b.p 100 ml.

V.- Medios.

- a) Medio E (cantidad por litro). Medio Aedes albopictus l.
 - Medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle (100 x) 100 ml.
 - Suero fetal bovino inactivado 1 hora a temperatura de 56°C 100 ml.

- Acido amino esencial (100 X) 10 ml.
- L-glutamina (200 uM) 10 ml.
- Bicarbonato de Sodio (7.5%) 10 ml.
- Agua bidestilada esterilizada 770 ml.

Ajustar la solución a pH 7.

b) Medio TRA (cantidad por litro).

- Medio de Leibovitz (L-15) 500 ml.
- Caldo triptosa fosfato 500 ml.

Ajustar pH a 7.2.

c) Agar Sangre Enriquecido.

- Base de agar sangre Difco (infusión carne-corazón, triptosa, cloruro de sodio y agar).
- 6% de suero de caballo inactivado a 56^oC por 30 minutos.
- 4% de eritrocitos de caballo lavados 3 veces con solución salina de fosfatos (buffer de pH 7.2) y hemolizadas con agua destilada o por rápido congelamiento a -60^oC y rápido descongelamiento a 37^oC.

d) Medio de Cultivo Líquido para Rickettsia.

- Suero de ternera fetal, filtrado y no inactivado ... 20 ml.
- Solución acuosa estéril 80 ml.
 - 1.- Extracto de levadura Difco (concentración final 0.12%) 0.12 g.
 - 2.- Cloruro de sodio (concentración final 0.5%) 0.5 g.
 - 3.- Buffer TRIS (hidroximetil) metil-2-aminoetano ácido sulfónico (TES) 1 M a pH 7.7 (concentración final 0.10 M). 10 ml.

Esta solución fué esterilizada en autoclave a 15 lb por 15 minutos y enfriada a 48-50^oC antes de -

adicionar el suero de ternero fetal. La concentración final fué calculada asumiendo una pérdida del 5% del fluido durante el autoclavado. 2.5 ml del medio se distribuyeron en tubos estériles con tapón de rosca.

VI.- Material Biológico.

- Antígeno de Rickettsia.
- Globulina de conejo antihumana conjugada con fluoresceína para enfermedades rickettsiales.
- Sero vitelino normal al 3% en PBS pH 7.6.
- Suero Control Negativo.
- Suero Control Positivo (suero de convalescente con título de 1:128 - 1:512).
- Cultivos Celulares:
 - a) HEP-2.
 - b) AAL.
 - c) TRA(TOXO).
- Cobayos machos adultos.

MÉTODOS.

I.- Recolección y tratamiento de muestras.

Se tomaron muestras de piojo de cuerpo y cabeza (Pediculus humanus var. corporis y capitis) al azar, en los Estados de Hidalgo y México, así como en el Distrito Federal. Las muestras - colectadas fueron divididas en varios lotes, donde cada lote re presenta a un individuo en particular. Cada lote, estaba consti tuido por 20 especímenes, tomados tanto de la cabeza como de las ropas de los individuos muestreados.

El número de lotes y de especímenes tomados por cada Estado, se resumen en la siguiente tabla.

TABLA VI. RECOLECCION DE MUESTRAS.

<u>ESTADO</u>	<u>NO. LOTES</u>	<u>NO. PIOJOS COLECTADOS</u>
DISTRITO FEDERAL	2	40
ESTADO DE HIDALGO	7	140
ESTADO DE MEXICO	6	120
T O T A L E S	15	300

En la vez que fueron colectadas las muestras, estas fueron - puestas en baño de hielo hasta el momento de llegar al laborato rio, donde una parte de cada lote fué congelada a -60°C , y otra parte fué procesada.

Cada lote fué probado para detectar la presencia de Rickettsia quintana, mediante el adecuado tratamiento. El tratamiento aplicado a cada lote fué el siguiente:

- 1) Preparar una Solución Buffer de Fosfatos o Solución Salina Fisiológica Estéril conteniendo 100 u/ml de Penicilina.

Adicionar 1 ml de esta solución en un tubo estéril.

- 2) Colocar 10 piojos en el tubo, agitar bien y tirar la solución.
- 3) Repetir este lavado 5 veces.
- 4) Lavar con solución buffer de fosfatos o solución salina fisiológica estéril sin antibiótico.
- 5) Repetir este lavado 3 veces.
- 6) Transferir los piojos a un mortero y triturar adicionando 4 ml de Medio Mínimo Escencial al 20% con suero. Este punto se realiza dentro de una campana de aspiración.
- 7) Dejar sedimentar dentro de un refrigerador a 4°C durante 5 minutos.
- 8) Colectar el sobrenadante, y dividirlo en cuatro partes -- iguales, que se distribuyen de la siguiente manera:
 - a) congelar en frascos viales a -60°C y utilizar para tinciones.
 - b) sembrar 0.1 ml en el medio de cultivo, Agar Sangre Enriquecido. El sobrante, congelarlo en frascos viales a -60°C.
 - c) inocular intraperitonealmente en un cobayo macho adulto.
 - d) congelar en frascos viales a -60°C para estudios antisépticos.

II.- Crecimiento de Rickettsias en agar sangre enriquecido y cámara con 5% de CO₂. Aislamiento Inicial.

Una de las partes obtenidas por cada lote del macerado de piojos, fué inoculada por estría (0.1 ml) en Medio Agar Sangre Enriquecido, e incubado a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ en aire.

Una vez inoculado el medio, las placas de agar fueron colocadas dentro de una jarra Gas-Pack en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (por medio de un sobre generador de anaerobiosis conteniendo Fosfógeno de Sodio, Bicarbonato de Sodio y Acido Cítrico).

Las placas fueron incubadas a 35°C, que según datos reportados es la temperatura óptima de crecimiento, durante 12-14 días aproximadamente (88).

III.- Esquema de Inmunización en Animales de Laboratorio.

A pesar de que Rickettsia quintana no puede ser propagada con facilidad en animales de laboratorio, de la suspensión preparada por trituración de artrópodos vivos se tomó 1 ml y se inoculó en cobayos machos adultos. El aislamiento se logra preferentemente por inoculación intraperitoneal.

Esta inmunización se realizó con dos finalidades:

- 1) Rickettsia quintana no se propaga con facilidad en animales de laboratorio, por lo tanto, si los piojos colectados estaban infectados con dicho microorganismo, ver la posibilidad de infección y las posibles alteraciones en diferentes órganos.
- 2) En caso de que se presente una infección asintomática, -- analizar por medio de la Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes un posible incremento en el título de anticuerpos. Para esto es necesario una muestra de sangre antes de la inoculación del cobayo, y otra 28 días después de la inoculación inicial o de la última inoculación en caso de pase.

Varios pesajes de tejidos de animales inoculados a interv

los de aproximadamente 14 días, pueden ser necesarios para que se desarrolle una buena cantidad de Rickettsias. En el cobayo, la única indicación de infección es un aumento de la temperatura rectal, por lo que esta fué registrada diariamente desde el momento de la inoculación. Generalmente en el primer pasaje no hay fiebre sino hasta 3 semanas después de la inoculación.

Diversos órganos y tejidos se cosechan del animal febril, se recomienda 1 o 2 cm³ de cada uno, obtenidos asepticamente colocados individualmente en contenedores estériles adecuados con tapón de rosca y congelados rápidamente a -60°C. Estos tejidos altamente contaminantes, se procesan individualmente, o cantidades iguales son combinadas como un pool e inoculadas intraperitonealmente en cobayo para el siguiente pasaje.

Si no hay fiebre ni evidencia de infección, animales en 2^o o 3er pasaje se deben sangrar al día 28 para estudio de anticuerpos, que puede ser la única evidencia de que se aislaron Rickettsias.

IV.- Tinción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes, utilizando como Antígeno el macerado de piojo.

Para este punto se realizó la siguiente técnica.

- 1) Del macerado de piojos de cada lote, colocar una gota en cada una de 6 fosas de una laminilla de fluorescencia.
- 2) Fijar media hora a temperatura ambiente y posteriormente 15 minutos en acetona.
- 3) Hacer diluciones con el suero control positivo, 0.01 ml de suero + 0.15 ml de saco vitelino normal, iniciando con una dilución de 1:16.
- 4) Se continúe haciendo diluciones dobles con volumen de 0.05 ml de PBS pH 7.2 hasta una dilución 1:512.

- 5) Agregar cada dilución del suero a la fosa respectiva del antígeno. En otra laminilla adicionar poco vitelino normal y PBS como controles de diluyente.
- 6) Colocar la lámina en cámara húmeda 30 minutos a 37°C.
- 7) Lavar con PBS cada lámina y luego sumergirlas por 5 minutos en una caja de Koplín con PBS.
- 8) Decantar este PBS y lavar con nuevo PBS durante 5 minutos. Posteriormente dejar secar al aire.
- 9) Agregar una gota de conjugado a cada fosa incluyendo controles.
- 10) Poner las láminas en cámara oscura e incubar 30 minutos a 37°C.
- 11) Lavar individualmente las láminas con PBS y luego sumergirlas en PBS 5 minutos en una caja de Koplín.
- 12) Decantar este PBS y lavar con nuevo PBS durante 5 minutos. Posteriormente dejar secar al aire.
- 13) Poner varias gotas de glicerol de montaje en la laminilla y colocar un cubreobjetos.
- 14) Observar al Microscopio de Fluorescencia con los objetivos de 40 X y 100 X para precisar la morfología. Colocar arriba del portaobjetos el aceite de inmersión.

Por medio de esta técnica, se trató de detectar el macerado de picjo con la presencia de Rickettsia quintana, que de estar presente, actuaría como antígeno y se observaría fluorescencia en las laminillas. Dependiendo de la cantidad del microorganismo en caso de estar presente, puede observarse fluorescencia en una o más fosas o diluciones; y en caso de que el microorganismo no este presente, no se observará fluorescencia en ninguna fosa o dilución.

V.- Tinción de Microorganismos Obtenidos en el Aislamiento Inicial.

De los microorganismos crecidos en Agar Sangre Enriquecido (aislamiento inicial), se tomó una muestra y se colocó sobre un portaobjetos, seguida por fijación a la flama. Posteriormente se realizó una tinción por los métodos de Giménez y Machiavello, mediante los siguientes procedimientos para identificar al microorganismo aislado.

1) Tinción de Giménez.

- Filtrar solución de carbol fuchina básica de trabajo gradualmente sobre el frotis durante 1 o 2 minutos.
- Lavar detenidamente al chorro de agua.
- Cubrir el frotis con verde de malaquita por 6-9 segundos.
- Lavar detenidamente al chorro de agua.
- Cubrir el frotis de nuevo con verde de malaquita por 6-9 segundos.
- Lavar detenidamente al chorro de agua.
- Secar al aire y examinar.

2) Tinción de Machiavello.

- Filtrar solución de carbol fuchina básica de trabajo gradualmente sobre el frotis durante 5-6 minutos.
- Decantar la fuchina y sumergir el frotis dentro de una solución fresca de ácido cítrico y en seguida lavar al chorro de agua.
- Filtrar solución de azul de metileno sobre el frotis por 10-15 segundos.
- Llevar al chorro de agua.
- Secar al aire y examinar.

VI.- Re sembrar de Microorganismos Específicos en Agar Sangre Enriquecido (Aislamiento Inicial).

De las placas de Agar Sangre Enriquecido que mostraron crecimiento, se tomaron muestras que se dividieron en cuatro partes, para el siguiente esquema de trabajo.

- 1) La primera parte se re sembró en Agar Sangre Enriquecido, cuya preparación fué anteriormente descrita.
- 2) Otra parte se re sembró en Medio de Cultivo Líquido para Rickettsias contenido en tubo, cuya preparación esta descrita en la sección de Medios.
- 3) La tercera parte se suspende en frascos viales conteniendo Solución Snyder II o Diluyente SPG, y congelada rápidamente a -60°C .
- 4) La cuarta parte se suspende en una solución de saco vitelino normal al 3% en PBS pH 7.6.

VII.- Inoculación de Cultivos Celulares.

Para este punto, el procedimiento empleado fué el siguiente:

- 1) De los frascos viales, que contienen 5 ml de una suspensión de Rickettsias en diluyente SPG (aisladas en Agar Sangre Enriquecido), se toman 0.5 ml de cada uno de los lotes a examinar; y se inoculan tubos de cultivo celular con células:
 - HEP-2; células de carcinoma de laringe.
 - AAL; células de Mosquito Aedes albopictus.
 - TRA (TOXO); células de Mosquito Toxorhynchites ambainensis.
- 2) Los tubos inoculados siguen el siguiente protocolo de diluciones

Stamp: **LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**
Stamp: **INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**
Stamp: **1971**
Stamp: **11/10/68**

	sin diluir	dil. 1/10	dil. 1/100	dil. 1/1000
Tubo 1		Tubos de trabajo		
Tubo 2		Tubos de Referencia		

Las diluciones se realizan con PBS pH 7.6. Se inoculan para cada lote, 2 tubos por cada dilución; y del tubo 1 se realiza pase y frotis (3 frotis), y del tubo 2, este solo se congela a -60°C .

- 3) Se deja 24 horas en contacto el inóculo con las células, y posteriormente se retira el inóculo y medio, y se coloca nuevo medio a las células.
- 4) Antes de cada pase se desprenden las células adheridas al tubo, según sea el caso (HEP-2 con tripsina; AAL con golpeteo y TOXO con golpeteo). Se centrifuga el tubo 30 minutos a 1500 rpm y 4°C ; y del sedimento se toma 1 ml y se hace pase a tubos con nuevas células.
- 5) Se repiten los puntos 3 y 4 las veces que sea necesario.
- 6) Los pases se realizan a los días 9, 22 y 32.
- 7) Se neutraliza el pH de los tubos en los intervalos de pases con Bicarbonato de Sodio estéril o agregando el Medio de Cultivo correspondiente con pH básico.
- 8) El Medio de Cultivo o de Crecimiento para cada tipo de célula es:
 - a) HEP-2: Medio Mínimo Esencial (Medio E) con Sales Eagle con 10% de Suero de Ternera Fetal inactivado.
 - b) AAL: Medio Mínimo Esencial (Medio E) con Sales Eagle, 10% de Suero de Ternera Fetal inactivado, Glutamina y Aminoácidos no esenciales.
 - c) TOXO: Medio Mínimo Esencial (Medio E) con Sales Eagle y Triptasa Fosfato Básica. Otro medio puede ser el Medio

- El uso de Leibovitz (L-15) con ácido pirúvico que ayuda al pH y Trintosa Fosfato.
- 9) El Medio de Mantenimiento y de Neutralización de pH para cada tipo de célula es:
- a) HEP-2: Igual al medio de cultivo.
 - b) AAL: Medio Mínimo Esencial con Sales Eagle y 10% de Suero de Ternera Fetal.
 - c) TOXO: Igual al medio de cultivo.

A las células TOXO, en forma adicional y opcional, se les puede adicionar Suero de Ternera Fetal al 2% para favorecer el crecimiento.

- 10) Debe realizarse una inspección rutinaria de contaminación microbiana, que consiste en observar diariamente los tubos de prueba de esterilidad o controles, y anotar todos los casos de contaminación, eliminando los cultivos contaminados tratando de identificar el origen u orígenes de la contaminación, intentando corregir la causa inmediatamente.
- 11) La temperatura de incubación para los cultivos celulares es:
- a) Células HEP-2: 34-37°C.
 - b) Células AAL: 28°C.
 - c) Células TOXO: 28°C.

VIII.- Tinción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes.

La Técnica de Anticuerpos Fluorescentes, empleando la Prueba Indirecta, fué utilizada para la confirmación de aislamiento de Rickettsia quintana. El procedimiento, fué aquel recomendado en el punto IV de esta sección, donde se utilizó como antígeno el macerado de piojo. Los antígenos aquí utilizados, incluyen:

- a) Células HEP-2, TOXO y AAL infectadas.
- b) Colonias aisladas en Agar Sangre Enriquecido suspendidas en una solución al 3% de sacc vitelino normal en PBS de pH 7.6; esto de los lotes que resultaron positivos en el aislamiento inicial.

El procedimiento fué:

- 1) El antígeno fué fijado en laminillas de fluorescencia con 12 fosas, primero a temperatura ambiente y posteriormente 15 minutos en acetona.
- 2) Estas placas fueron incubadas con un suero positivo específico diluido desde 1:16 hasta 1:512 por medio de diluciones dobles realizadas con PBS de pH 7.6. La fosa 1 de la laminilla contiene la dilución 1:16 y se continúa la secuencia a modo de que la fosa 6 contenga la dilución de 1:512.
- 3) Posterior a la incubación, las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con Globulina de Conejo Antihumana Conjugada con Fluoresceína e incubadas de nuevo.
- 4) Por último y antes de realizar las lecturas, las placas se lavan de nuevo con PBS, se secan al aire y se les colocan varias gotas de glicerol de montaje.

Las lecturas fueron realizadas en un sistema óptico designado para el estudio de anticuerpos fluorescentes, y de este modo confirmado el aislamiento de Rickettsia quintana.

Esta prueba debe también incluir los correspondientes controles de diluyente y suero control negativo.

Los sueros control, tanto positivo como negativo, fueron proporcionados por el Dr. Joseph E. McDade, Jefe del Laboratorio de Rickettsias del Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia U.S.A.

IX.- Cuento de Rickettsias en Solución.

De las Rickettsias obtenidas en el aislamiento inicial y re-
siembra, suspendidas en solución SNYDER II (diluyente SPG); se --
realizaron diluciones desde 10^{-4} hasta 10^{-7} con el mismo diluen-
te, es decir, solución SNYDER II (123). Se tomaron 0.05 ml de
cada dilución y se sembraron en Agar Sangre Enriquecido o suple-
mentado.

El número de colonias obtenidas en la dilución de 10^{-5} se -
divide entre 10, y el número obtenido en la dilución 10^{-7} se mul-
tiplica por 10; y de este modo, obtener 3 diluciones de 10^{-6} . La
media obtenida de estas diluciones, se multiplica por 20, para -
obtener el número aproximado de colonias por mililitro. El núme-
ro obtenido se multiplica por 10^6 para darnos el número de Ri-
ckettsias viables en la suspensión sin diluir; y este número a -
su vez, nos indica el número de Rickettsias que se encuentran por
mililitro en los viales con suspensión.

Este conteo, se realizó para todos los lotes positivos, ob-
tenidos tanto del aislamiento inicial, como del primer pase en -
Agar Sangre Enriquecido o Suplementado.

X.- Comparación de Crecimiento de la Rickettsia Obtenida y Otras Bacterias, en Agar Sangre Enriquecido y Medio Líquido para Rickettsias.

La comparación en el crecimiento de Rickettsia quintana con
otros microorganismos, fué realizada utilizando las siguientes -
bacterias:

- 1.- Salmonella drypool.
- 2.- Shigella boydii.
- 3.- Staphylococcus aureus.
- 4.- Streptococcus B-hemolítico.

Para esto, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- a) Agar Sangre Enriquecido para Rickettsias.
- b) Agar Sangre Normal.
- c) Medio Líquido para Rickettsias.
- d) Medio Líquido Infusión Cerebro Corazón (MCI).

Las condiciones generales de crecimiento para los Diagramas de Trabajo II y III, fueron las siguientes:

- 1.- La temperatura de incubación fué de 33°C para los medios sólidos, y de 35°C para los medios líquidos. Esto debido a que son las temperaturas óptimas de crecimiento para -- las Rickettsias.
- 2.- las Rickettsias sembradas, fueron las obtenidas en Agar Sangre Enriquecido, tanto del aislamiento inicial como -- del primer pase.
- 3.- Todas las placas y tubos inculados, fueron sembrados tan -- to en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

XI.- Comparación de la Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes, entre Rickettsias y otras Bacterias.

De las bacterias utilizadas en la comparación de crecimiento entre Rickettsias y otras bacterias, se tomó una muestra homogénea de las 4 especies, y se suspendieron en una solución al 3% - de Saco Vitelino Normal en PBS de pH 7.6.

Posteriormente, se realizó la Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes utilizando dichas suspensiones como antígenos e incubadas con diluciones de un Suero Control Positivo de Rickettsia quintana. La técnica empleada es la misma descrita anteriormente. La finalidad primordial de esta prueba, es la de analizar si puede existir reacción cruzada entre bacterias de tipo grampositivas y gramnegativas, con las Rickettsias aisladas.

DIAGRAMA DE TRABAJO PARA CONFIRMACION DE RICKETTSIA QUINTANA EN MEDIO SOLIDO.

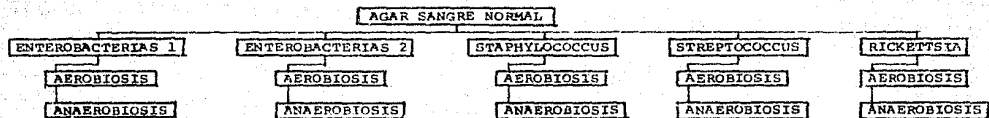
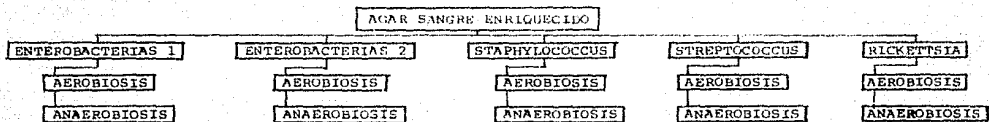
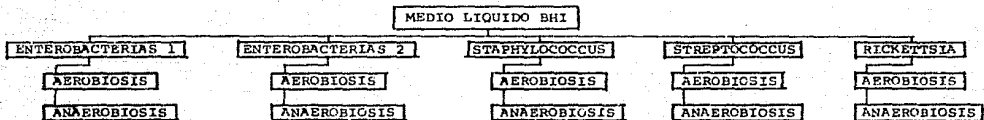
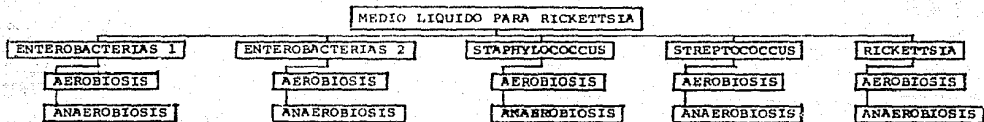


DIAGRAMA I Y I
DIAGRAMA DE TRABAJO PARA CONFIRMACION DE RICKETTSSIA QUINTANA EN MEDIO LIQUIDO.



RESULTADOS

I.- Aislamiento Inicial.

El Aislamiento Inicial, se logró en Agar Sangre Enriquecida en una atmósfera de 5% de Dióxido de Carbono (CO₂). Dicho aislamiento se logró con un periodo de incubación de 12-14 días, -- y los resultados se muestran en la Tabla No. VII.

TABLA VII. RESULTADOS DEL AISLAMIENTO INICIAL.

<u>ESTADO</u>	<u>LOTE NO.</u>	<u>RESULTADO</u>
DISTRITO FEDERAL	1	NEGATIVO
DISTRITO FEDERAL	2	POSITIVO
ESTADO DE HIDALGO	1	POSITIVO
ESTADO DE HIDALGO	2	POSITIVO
ESTADO DE HIDALGO	3	POSITIVO
ESTADO DE HIDALGO	4	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	5	POSITIVO
ESTADO DE HIDALGO	6	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	7	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	1	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	2	POSITIVO
ESTADO DE MEXICO	3	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	4	POSITIVO
ESTADO DE MEXICO	5	POSITIVO
ESTADO DE MEXICO	6	NEGATIVO

Estos resultados, pueden resumirse y expresarse en Porcentaje de Positividad como se muestra en la Tabla No. VIII.

Los lotes catalogados como positivos fueron resebrados, resultando positivos además del aislamiento inicial, en subcultivos (Pase 1 y Pase 2) realizados a partir del aislamiento inicial; y en donde, las condiciones de crecimiento fueron las mismas.

TABLA VIII. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD
EN EL AISLAMIENTO INICIAL.

<u>ESTADO</u>	<u>LOTES (+)</u>	<u>LOTES (-)</u>	<u>POSITIVIDAD</u>
DISTRITO FEDERAL	1	1	50%
ESTADO DE HIDALGO	4	3	57.14%
ESTADO DE MEXICO	3	3	50%

Las colonias crecidas en el agar, miden aproximadamente de 10-200 μ m de diámetro, y presentan un área lisa en contacto con la superficie del agar. La parte central de la colonia fué superior a las 40 μ m de grueso.

La característica de la colonia, fué la siguiente: colonias redondas, lenticulares, translúcidas y mucoides.

Como se mencionó anteriormente el aislamiento inicial requiere incubación a 37 $^{\circ}$ C por 12-14 días, y los subcultivos de 3-5 días. Los aislamientos iniciales fueron conservados por emulsificación de las colonias en solución de Sacarosa-Glutamato-Fosfato (SPG o SNEYDER II) a pH 7. Pasos subsiguientes fueron efectuados presentando o dispersando las colonias conservadas en solución SPG e inoculadas en placas de Agar Sangre. La viabilidad de los microorganismos fué retenida suspendiendo colonias en solución SPG, rápidamente congeladas y conservadas a -60 $^{\circ}$ C.

La solución SPG es un medio compuesto de sacarosa y glutamato en un buffer de fosfato de potasio a pH 7, que es el pH óptimo de supervivencia de las Rickettsias, aunque sobreviven en un rango de 6.5 - 7.4 de pH.

II.- Infección en Animales de Laboratorio.

De acuerdo al protocolo de inmunización planteado inicialmente, se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla No. IX:

TABLA IX. RESULTADOS DE LA INOCULACION EN ANIMALES DE LABORATORIO.

<u>ESTADO</u>	<u>LOTES (+)</u>	<u>LOTES (-)</u>
DISTRITO FEDERAL	0	2
ESTADO DE HIDALGO	2	5
ESTADO DE MEXICO	0	6

Se denominó e consideró lote positivo, al lote cuya suspensión produjo en el animal de experimentación, un aumento de temperatura mayor o igual a los 40°C.

Como se puede observar de los 15 lotes recolectados, solo dos presentaron la característica antes mencionada, y fueron los lotes 3 y 5 del Estado de Hidalgo.

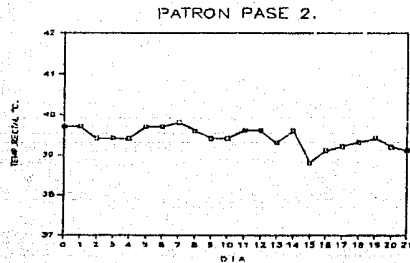
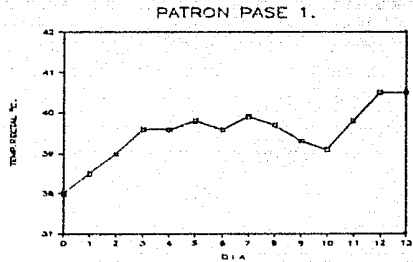
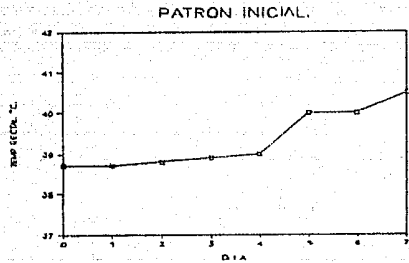
Analizando primeramente el Lote 3, tanto en la Tabla No. X como en la Gráfica No. 3; se muestra la temperatura rectal en grados centígrados (°C) del animal inoculado, y en cada pase se utiliza un nuevo animal. La temperatura del día 0 representa la temperatura basal del animal antes de ser inoculado.

En el caso del lote 3, como puede observarse, al séptimo día posterior a la inoculación inicial, el animal presenta por tercer día consecutivo, una temperatura mayor o igual a 40°C; por lo que se sacrificó para observar posibles alteraciones en diversos órganos. Los órganos analizados así como los resultados son los siguientes:

TABLA X. PATRON DE FIEBRE LOTE 3

PATRON INICIAL		PATRON FASE 1		PATRON FASE 2	
X (DIA)	Y (TEMP. RECTAL)	X	Y	X	Y
0	38.70	0	38.00	0	39.70
1	38.70	1	38.50	1	39.70
2	38.80	2	39.00	2	39.40
3	38.90	3	39.60	3	39.40
4	39.00	4	39.60	4	39.40
5	40.00	5	39.80	5	39.70
6	40.00	6	39.60	6	39.70
7	40.50	7	39.70	7	39.80
		8	39.70	8	39.60
		9	39.30	9	39.40
		10	39.10	10	39.40
		11	39.80	11	39.60
		12	40.50	12	39.60
		13	40.50	13	39.30
				14	39.60
				15	38.80
				16	39.10
				17	39.20
				18	39.30
				19	39.40
				20	39.20
				21	39.10

GRAFICA 3. PATRON DE FIEBRE LOTE 3.



- Ganglios: inflamados y hemorrágicos.
- Hazo: disminuido de tamaño.
- Hígado: hemorrágico.
- Cerebro: normal.
- Pulmón: normal.
- Patas y orejas: con necrosis.
- Visceras: distendidas.

Cabe aclarar que a todos estos órganos, se les observa una consistencia fibrosa que dificulta su procedimiento.

De estos tejidos considerados altamente contaminantes, se tomaron aproximadamente 2 cm³; se procesaron individualmente, y cantidades iguales se combinaron como un pool e inocularon intra peritonealmente para el siguiente pasaje.

El Patrón de Fiebre del Pase 1 (Patrón Pase 1) se muestra en la Tabla No.X y se representa en la Gráfica 3. Como puede observarse, al décimo tercer día, el animal del Pase 1 fué sacrificado por presentar temperatura mayor o igual a 40°C. El análisis de diversos órganos reveló las mismas características que se presentaron en el animal utilizado para el aislamiento inicial. De igual forma los tejidos se procesaron individualmente, y cantidades iguales se combinaron como un pool e inocularon intraperitonealmente en cobayo para el siguiente pase.

El Patrón de Fiebre del Pase 2 (Patrón Pase 2) se muestra en la Tabla No.X y su representación en la Gráfica 3. Este animal no presentó temperatura mayor a 40°C, por lo que al día 21 - posterior a la inoculación del Pase 1, se sangró por punción cardíaca para determinar en sangre el Título de Anticuerpos por la Técnica de Microinmunofluorescencia; que sería la única evidencia de que se aislaron Rickettsias; y que en este caso, dicho título no fué lo suficientemente representativo para poder afirmar

el aislamiento de Rickettsias.

En lo referente al Lote 5, en la Tabla No. XI se muestra el Patrón de Fiebre de dicho lote, y en la Gráfica 3 la representación del mismo. Como puede observarse en el Patrón Inicial, al séptimo día posterior a la inoculación, el animal presentó por segundo día consecutivo temperatura mayor o igual a 40°C . Al analizar los órganos anteriormente mencionados, se encontró que presentaban las mismas características encontradas en los animales inoculados con el macerado del Lote 3.

De igual manera los tejidos se procesaron individualmente, y cantidades iguales se procesaron combinaron como un pool e inocularon intraperitonealmente para el siguiente pase. El Patrón de Fiebre del Pase 1 (Patrón Pase 1) se muestra también en la Tabla No. XI y su representación en la Gráfica 4. Este animal, ya no presentó temperatura mayor o igual a los 40°C , por lo que al día 21 posterior a la inoculación del pase, se sangró por punción cardiaca para determinar el Título de Anticuerpos por la técnica de Microinmunofluorescencia; y que también en este caso el título de anticuerpos no fué representativo para afirmar el aislamiento de Rickettsias.

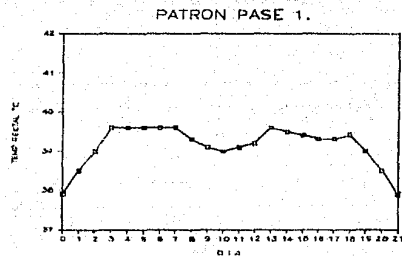
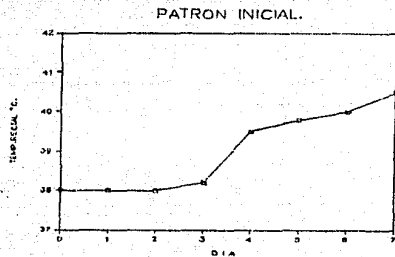
La determinación del Título de Anticuerpos se realizó por la técnica de microinmunofluorescencia descrita en el inciso IV de Material y Métodos.

En forma adicional y no referida en Material y Métodos, se realizó la observación de frotis de los órganos analizados, tratados por tinción de fluorescencia, encontrándose sugestivos única y exclusivamente los frotis de Exudado Peritoneal; esto tanto en el aislamiento inicial, como en los diferentes pases.

TABLE XI. PATRON DE FIEBRE LOTE 5.

PATRON INICIAL		PATRON PASE 1		PATRON PASE 2	
X (DIA)	Y (TEMP. RECTAL)	X	Y	X	Y
0	38.00	0	37.90		
1	38.00	1	38.50		NO REALIZADO
2	38.00	2	39.00		
3	38.20	3	39.60		
4	39.50	4	39.60		
5	39.80	5	39.60		
6	40.00	6	39.60		
7	40.50	7	39.60		
		8	39.30		
		9	39.10		
		10	39.00		
		11	39.10		
		12	39.20		
		13	39.60		
		14	39.50		
		15	39.40		
		16	39.30		
		17	39.30		
		18	39.40		
		19	39.00		
		20	38.50		
		21	37.90		

GRAFICA 4. PATRON DE FIEBRE LOTE 5.



III.- Microinmunofluorescencia utilizando como Antígeno el Macerado de Píjoco.

Después de seguir la metodología descrita en la sección anterior, y de realizar las observaciones al Microscopio de Fluorecencia, los resultados de la Tabla No. XII por cada Lote y Estado, mostraron lo siguiente.

TABLA XII. RESULTADOS DE LA MICROINMUNOFLUORESCENCIA DEL MACERADO DE PIJOCO.

<u>ESTADO</u>	<u>LOTE NO.</u>	<u>RESULTADO</u>
DISTRITO FEDERAL	1	NEGATIVO
DISTRITO FEDERAL	2	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	1	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	2	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	3	SUGESTIVO
ESTADO DE HIDALGO	4	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	5	SUGESTIVO
ESTADO DE HIDALGO	6	NEGATIVO
ESTADO DE HIDALGO	7	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	1	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	2	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	3	SUGESTIVO
ESTADO DE MEXICO	4	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	5	NEGATIVO
ESTADO DE MEXICO	6	SUGESTIVO

Ningún lote pudo darse como positivo totalmente, debido a que en el campo del microscopio se observaban, además de pequeños cuerpos que podían ser Rickettsias, otros cuerpos de mayor

tamaño que podrían ser pequeñas fibras del órgano fijado en el --
frotis. Debido a ello, esta técnica no es un indicio total de la
presencia de Hickettsia quintana en los piojos colectados.

IV.- Tinción de Microorganismos.

Después de llevar a cabo el frotis de los microorganismos - crecidos en Agar Sangre Enriquecido, se prosiguió a teñirlos por medio de las Técnicas de Giménez y Machiavello, obteniéndose los siguientes resultados.

Por medio de la Técnica de Giménez, se pueden observar en - el campo del microscopio, pequeños bacilos o formas filamentosas teñidas de color rojo en un fondo de color verde. El color rojo es dado a las posibles Rickettsias por la solución de carbol fuchina básica filtrada en forma gradual sobre el frotis; y el verde de malaquita da la coloración de contraste ya que tiene mayor afinidad por el fondo que por la Rickettsia misma.

En cuanto a la Técnica de Machiavello, se observó en el campo del microscopio pequeños bacilos de color rojo en un fondo de color azul. El color rojo, también en este caso, fué debido a la solución de carbol fuchina básica. Sin embargo se encontró, que el ácido cítrico como decolorante, no lo hacía de una manera específica, es decir, que no desteñía a otros elementos presentes en el frotis más que a las Rickettsias. Se encontró también que en el modo de ejecutar la coloración de Machiavello, la mayoría de la fuchina se perdía del frotis durante la adición de azul de metileno. Este ocurre como proceso de la sustitución de un colorante básico por otro (fuchina básica por azul de metileno), y como resultado de esto no hay una buena coloración de contraste para las Rickettsias.

En forma adicional se realizó una Tinción de Gram y de Giemsa; observándose bacilos gramnegativos en la Tinción de Gram, y bacilos teñidos de color púrpura en la Tinción de Giemsa.

V.- Subcultivo de Microorganismos en Medio Líquido para Rickettsias.

La colonia utilizada para el subcultivo fué una colonia erigida en Agar Sangre, idéntica a la colonia tipo de Rickettsia quintana descrita en la literatura. Los cultivos fueron incubados sin agitación con la tapa del tubo floja a 35-36°C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Una visible turbidez fué notada en los cultivos por primera vez, después de cuatro días de incubación.

Este subcultivo en Medio Líquido para Rickettsias, solo se realizó para comprobar el hecho de que el Suero de Ternera Fetal satisface el requerimiento de Rickettsia quintana por el lizado de células rojas, y provee el crecimiento de microorganismos en un medio líquido.

Estos cultivos fueron negativos para el crecimiento de bacterias, y la presencia de organismos idénticos a Rickettsia quintana en los mismos. fué confirmada por la Tinción de Giménez y la Técnica de Microinmunofluorescencia Indirecta.

VI.- Inoculación de Cultivos Celulares.

De la observación microscópica rutinaria y diaria de los tubos inoculados con las tres líneas celulares utilizadas, los resultados obtenidos del cultivo in vitro, se muestran en la Tabla No. XIII.

Las indicaciones para la interpretación de la misma, son las siguientes:

- (+) Un número moderado de células contienen algunos organismos sencillos.
- (++) Varias células contienen ya varios microorganismos.
- (+++) Varias células contienen dispersos por todo el citoplasma, grupos de organismos en masas compactas.
- (++++) El citoplasma de todas las células fué remplazado por los microorganismos, y los cultivos son desintegrados.
- (+++++) Crecimiento abundante de los microorganismos, que pueden ser vistos extracelularmente ya sea como organismos sencillos, o bien en pequeñas masas.
- (-) Proliferación nula.

La confirmación de infección a estas líneas celulares, se realizó por la Técnica de Tinción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes.

TABLA XIII. RESULTADO DE LA INOCULACION DE CULTIVOS CELULARES.

DIAS DE INCUBACION	CRECIMIENTO EN LINEA CELULAR		
	HEP-2	TOXO	AAL
2	++	-	-
9	+++	+	+
22	++++	++	++
32	+++++	+++	+++

VII.- Tinción Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes.

Los antígenos aquí utilizados incluyeron las células HEP-2, TOXO y AAI infectadas, así como las colonias aisladas en Agar -- Sangre Enriquecido suspendidas en una solución al 3% de suero vitelino normal en solución buffer de fosfatos (PBS) de pH 7.6, de los lotes que resultaron positivos en el aislamiento inicial.

Las lecturas realizadas en el sistema óptico designado para el estudio de anticuerpos fluorescentes mostraron positividad en la mayoría de las diluciones, y de este modo confirmado el aislamiento de Rickettsia quintana.

Los resultados se muestran en la Tabla No. XIV y Tabla No. XV.

TABLE XIV. TINCION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES EN CULTIVOS CELULARES.

CELULAS	DILUCION MAXIMA A LA QUE MOSTRARON POSITIVIDAD
HEP-2	1:512
TOXO	1:32
AAI	1:32

TABLE XV. TINCION DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES DE CEPAS AISLADAS EN AGAR SANGRE.

COLONIAS Y CONTROLES	DILUCION MAXIMA A LA QUE MOSTRARON POSITIVIDAD
COLONIAS	1:2048
CONTROL DE DILUENTE	NEGATIVO
SUERO CONTROL POSITIVO	POSITIVO
SUERO CONTROL NEGATIVO	NEGATIVO

VIII.- Contec de Rickettsias en solución.

Debido a la falta de material y reactivos, solo se utilizaron los siguientes lotes positivos de cada uno de los Estados en estudio.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. XVI.

TABLA XVI. CONTEO DE RICKETTSIAS EN SOLUCION.

	LOG. DILUCION	NO. DE RICKETTSIAS EN EL INGULO	MEDIA (X)	*NO. DE RICKETTSIAS POR ML. EN DILUCION
DISTRITO FEDERAL	10 ⁻⁵	338 396 309 293	334	
(LOTE 2)	10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷	36 37 37 18 54 3 3 2 3 2	36 3	6.62 x 10 ⁸
ESTADO DE HIDALGO	10 ⁻⁵	375 402 340 398	379	
(LOTE 3)	10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷	41 40 35 12 19 4 3 4 3 3	29 3	6.46 x 10 ⁸
ESTADO DE MEXICO	10 ⁻⁵	298 272 315 310	299	
(LOTE 5)	10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷	25 31 19 22 15 2 3 4 1 5	22 3	5.46 x 10 ⁸

- (*) Este nos indica el número de Rickettsias viables en la suspensión sin diluir, y este número a su vez, nos indica el número de Rickettsias que se encuentran por mililitro en los viales con suspensión.

IX.- Comparación de crecimiento de la Rickettsia obtenida y otras bacterias.

Las bacterias utilizadas fueron:

- 1) Salmonella dysenteriae (Sd).
- 2) Shigella boydii (Sb).
- 3) Staphylococcus aureus (Sa).
- 4) Streptococcus B-hemolítico (Sbh).

También se utilizó la Rickettsia aislada (Rq).

Las condiciones de crecimiento fueron; Aerobiosis (AE) y Anaerobiosis (AN).

Los resultados obtenidos fueron los que a continuación se muestran en los Diagramas IV y V; y se indica con el signo (+) el crecimiento positivo, y con el signo (-) el crecimiento negativo.

DIAGRAMA IV.

RESULTADOS DEL TRABAJO PARA CONFIRMACION
DE RICKETTSTIA QUINTANA EN MEDIO SOLIDO

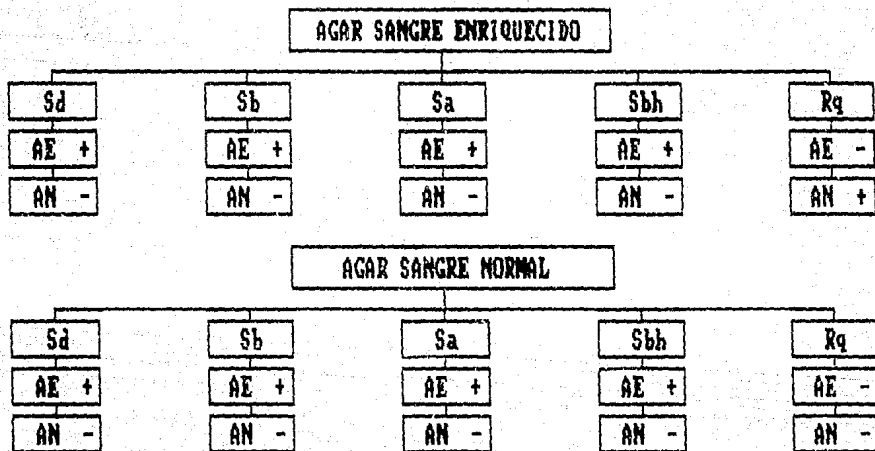
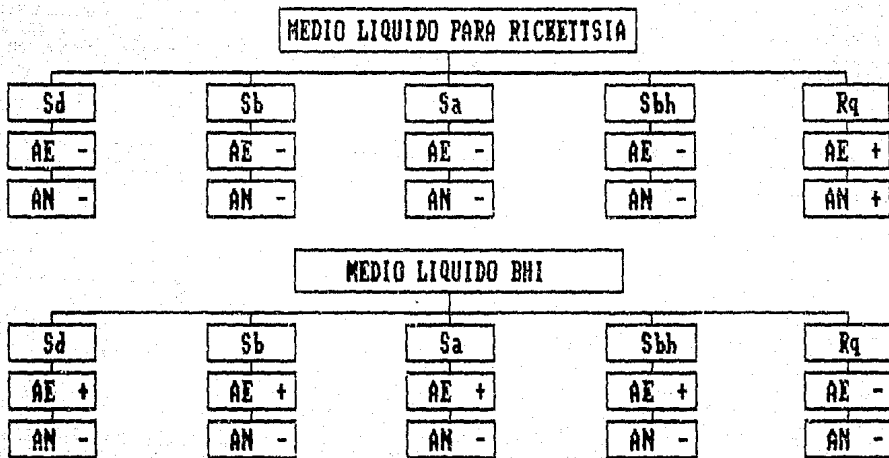


DIAGRAMA V.

RESULTADOS DEL TRABAJO PARA CONFIRMACION
DE RICKETTSIA QUINTANA EN MEDIO LIQUIDO.



X.- Comparación en la Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes entre Rickettsias y otras Bacterias.

La utilización de suspensiones de bacterias en caso vitelino normal como antígenos, e incubadas con diluciones de sueros - control positivo y control negativo de Rickettsia quintana; fué efectuada para comprobar la especificidad de la prueba, y para analizar la posible reacción cruzada entre este tipo de bacterias y las Rickettsias aisladas.

Las lecturas fueron realizadas en el sistema óptico designado para el estudio de anticuerpos fluorescentes, y los resultados se muestran en la Tabla No. XVII.

TABLA PRUEBA INDIRECTA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES ENTRE RICKETTSIAS Y OTRAS BACTERIAS.

MICROORGANISMO	RESULTADO
SALMONELLA DRYPOOL	NEGATIVO
SHIGELLA BOYDII	NEGATIVO
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO
STREPTOCOCCUS B-HEMOLITICO	NEGATIVO
RICKETTSIA	POSITIVO

DISCUSSION

Microorganismos indistinguibles de Rickettsia quintana fueron aislados en Agar Sangre Enriquecido, de piojos de cuerpo y cabeza.

De los 15 lotes recolectados, solo 2 presentaron la característica de que su suspensión produce en el animal de experimentación (cobayo macho adulto), un aumento de temperatura mayor o igual a los 40^oC. El Patrón Inicial en este caso, correspondió a la inoculación de la suspensión preparada por trituración de artrópodos vivos. El único huésped experimental de Rickettsia quintana es el Mono Rhesus; pero el anticuerpo específico puede producirse en conejos y cobayos inmunizados con antígenos solubles, o de células enteras en conyuvante de Freund.

En sus propiedades morfológicas y de tinción, así como en su comportamiento; los organismos son indistinguibles de Rickettsia quintana descrita en la literatura.

Los microorganismos aislados se parecen a las Rickettsias en su tamaño y estructura celular. Es gramnegativa y se colorea como las Rickettsias por los métodos de Giachuz y Machiavello.

Rickettsia quintana es distinta de todas las otras Rickettsias por su contenido de G + C de 38.6 por ciento. Esta característica contribuyó a la reciente identificación del agente "patrón de Baker" como Rickettsia quintana. Este fue el primer aislamiento de Rickettsia quintana en la naturaleza, de una fuente mamífera no humana (132).

La segunda diferencia importante, entre Rickettsia quintana y las demás Rickettsias, es su capacidad para crecer en medios libres de células.

Myers y colaboradores en 1972 (88), demostraron una necesidad de hematina para el crecimiento de Rickettsia quintana, deduciendo que se requería como precursor en la síntesis de diversas hemoproteínas. Rickettsia quintana no crece en sustitutos de

hematina que satisficían a otras bacterias con necesidad de la misma. Aparentemente, tiene un requerimiento absoluto de hematina para la síntesis de hemoproteínas.

El estudio en un Medio Líquido recomendado para el subcultivo de Rickettsias, solo se realizó para comprobar el hecho de que el suero de ternera fetal satisface el requerimiento de Rickettsia quintana por el lisado de células rojas, y provee el crecimiento de estos microorganismos. Este hecho enfatiza la probable necesidad por los eritrocitos y otros factores del suero, diferentes a la hemoglobina en la nutrición de Rickettsia quintana. Esto demuestra también la presencia de otros factores diferentes a los eritrocitos y suero como la hemoglobina, que estimula el crecimiento de microorganismos (87).

El extracto de levadura provee una vía de aminoácidos para el crecimiento. La actividad del crecimiento parece ser dada por un componente normal en el suero, ampliamente distribuido en terneras fetales. Este factor activo ha demostrado ser: 1) no dializable, 2) resistente al calentamiento a 56°C por 30 minutos, y 3) parcialmente inactivado a 100°C en dos minutos y completamente inactivado a 100°C por 10 minutos. El ciclo de crecimiento en este medio se caracteriza por una fase de demora de unas 24 horas, una fase de crecimiento exponencial de 72 horas y un tiempo de depilación de aproximadamente 4.5 horas (77, 88).

En lo referente al cultivo de células, en las líneas celulares AAL y TOXO, las observaciones descritas para las células HEP 2, no fueron visibles tan claramente. Esto puede deberse a la capacidad de las líneas celulares AAL y TOXO, para ser menos susceptibles a una infección por microorganismos de este tipo (31).

Con esto podemos afirmar que el Agar Sangre Enriquecido y el Medio Líquido para Rickettsia, son dos medios diferentes específicos para el crecimiento de Rickettsia quintana (125).

La comparación en la Prueba Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes entre la Rickettsia aislada y otras bacterias, comprobó el hecho de que no existe reacción cruzada entre esta y las bacterias del tipo grampositivo y gramnegativo utilizadas. Este resultado demuestra que la Rickettsia aislada es idéntica a Rickettsia quintana descrita en la literatura (93).

El procedimiento clásico para la identificación definitiva de Rickettsia quintana requiere la inducción de la Fiebre de las Trincheras clínicamente típica en personas, ya que la prolongada rickettsemia, distingue a esta de otras Rickettsias.

El presente estudio confirma el reporte de Varela (123) - de la existencia de Rickettsia quintana en la Ciudad de México, además de los Estados de Hidalgo y Estado de México. Es importante porque a pesar de la presencia del agente etiológico en México, los casos de "Fiebre de las Trincheras" no han sido reconocidos. Esta discrepancia sugiere que Rickettsia quintana existe en México en equilibrio ecológico, con el piojo como vector y el humano como hospedero, y que el potencial de una Epidemia de "Fiebre de las Trincheras" debe ser por lo tanto considerado.

Laboratorios de Investigación y Salud Pública interesados en investigaciones ecológicas y epidemiológicas, han resuelto -- que generalmente no es obtenible el diagnóstico clínico de laboratorio. Los estudios de campo requieren de los servicios colectivos de entomólogos y epidemiólogos que conocen el potencial de artrópodos vectores y hospederos reservorios que pueden ser investigados, así como para su colección y manipulación. Estas especies pueden ser procesadas en el campo, de una manera que provee al laboratorio con materiales que sean adecuados para obtener una información acerca de una posible infección con agentes rickettsiales.

CONCLUSIONES

- 1.- La Técnica de Microinmunofluorescencia Indirecta para detección de rickettsia en humano, resultó ser altamente sensible, ya que puede detectarse hasta en una dilución de 1:2048. Es reproducible ya que las lecturas ópticas de una muestra - no llegan más allá de dicha dilución. Es específica ya que - se demostró que no existe reacción cruzada con cierto tipo - de bacterias, ni tampoco existen falsos positivos.
- 2.- La Técnica de Microinmunofluorescencia Indirecta para Rickettsias, puede ser una herramienta útil para laboratorios que - se dediquen a la Virología Diagnóstica con presupuestos limi- tados; pues si bien el gasto es grande al principio, este se compensa con la gran cantidad de muestras que pueden ser pro- cesadas, gastando un mínimo de reactivos. La estabilidad de los reactivos es muy alta, ya que en el laboratorio no se ob- servaron deterioros en un periodo de 14 meses.
- 3.- En cuanto a la disponibilidad de los resultados, esta técni- ca nos permite tenerlos en un máximo de 6 horas, después de recibida una muestra de suero de enfermos con piojos; lo cual comparado con otras técnicas como inoculación o cultivo de - células, animales de laboratorio o huevos embrionados, resul- ta ser mucho más rápida.
- 4.- Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron un por- centaje relativamente alto (53.33 %) de casos de personas con piojos infectados por rickettsias; y de las muestras que no se pudo aislar el microorganismo en estudio (46.66 %), fueron congeladas con la finalidad de que más adelante vuel- van a ser examinadas para buscar agentes bacteriales, vira- les o rickettsiales que se describan como nuevos agentes --- etiológicos transmitidos por piojos.

5.- Se considera por ahora, que el siguiente paso será el analizar el comportamiento inmunológico de las personas con enfermedades rickettsiales mediante la titulación de anticuerpos en suero.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABINANTI FR and MARMION BP. Protective or neutralizing anti body in Q fever. Am J Hyg 66: 173-195, 1957.
- 2.- ALLISON AC and BURKE DC. The nucleic acid contents of viruses. J Gen Microbiol 27: 191-194, 1962.
- 3.- ANACKER RL, PICKENS EG and LACKMAN DB. Details of the ultra structure of *R. prowazekii* grown in the chick yolk sac. J Bacteriol 94: 260-262, 1967.
- 4.- ANDERSON DR, HOTPS HE, BARILE MP and BERNHEIM BC. Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and mycoplasma in tissue culture. J Bacteriol 90: -- 1337-1404, 1965.
- 5.- BARKER JA. A rickettsial infection in canadian voles. J Exp Med 94: 37-51, 1946.
- 6.- BARKER LF and PATT JK. Production of rickettsial complement fixing antigens in tissue culture. J Immunol 100: 821-824, 1968.
- 7.- BARKER LF, PATT JK and HOPPS HE. Titration and neutralization of *Rickettsia tsutsugamushi* in tissue culture. J Immunol 100 825-830, 1968.
- 8.- BEAMAN L and WISSEMAN CL Jr. Mechanisms of immunity in typhus infections VI. Differential opsonizing and neutralizing action of human typhus rickettsia-specific cytophilic antibodies in cultures of human macrophages. Infect Immun 14: - 1071-1076, 1976.
- 9.- BRAMAN L and WISSEMAN CL Jr. Mechanisms of immunity in typhus infections VII. Demonstration of *Rickettsia mooseri*-specific antibodies in convalescent mouse and human serum cytophilic for mouse peritoneal macrophages. Infect Immun 14: - 1065-1070, 1976.

- 10.- BUCHANAN RE and GIBBONS NE. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. The Rickettsias. 8th Edition. Williams -- and Wilkins Company. Baltimore, 1974. PP 882-893.
- 11.- BOVARNICK MR and MILLER JC. Oxidation and transamination - of glutamate by typhus rickettsiae. *J Biol Chem* 184: 661-676, 1950.
- 12.- BOVARNICK MR, MILLER JC and SNYDER JC. The influence of certain salts, aminoacids, sugars and proteins on the stability of rickettsiae. *J Bacteriol* 59: 509-522, 1950.
- 13.- BOZEMAN FM and ELISBERG BL. Serological diagnosis of scrub typhus by indirect immunofluorescence. *Proc Soc Exp Biol - Med* 112: 568, 1963.
- 14.- BOZEMAN FM, HOPPS HE and SMADEL JE. Study on the growth of rickettsiae I. A tissue culture system for quantitative estimations of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Immunol* 76: 475-488, 1956.
- 15.- BOZEMAN FM, MASIELLO SA and ELISBERG BL. Epidemic typhus - rickettsiae isolated from flying squirrels. *Nature* 255: -- 545-547, 1975.
- 16.- BRAUDR ABRAHAM I and DOLBI JM. *Microbiología Clínica. Rickettsias*. 1a Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires 1984. PP 563-580.
- 17.- BREZINA R, MURRAY ES, TARIZZO ML and BOGEL K. Rickettsiae and rickettsial diseases. *Bull Who* 49: 433-442, 1973.
- 18.- B'RGDORFER W. Evaluation of the fluorescent antibody technique for the detection of Rocky Mountain spotted fever rickettsias in various tissues. *Pathol Microbiol* 24 (Suppl) 27-49, 1961.
- 19.- BURNETT JW. Rickettsioses: a review for the dermatologist. *J Am Acad Dermatol* 2 (5): 359-373, May 1980.
- 20.- CARUNA S. Rickettsial diseases. *Trop Dis Bull* 71 (8): 781-786, Aug 1974.

- 21.- CASTAÑEDA MR. Differentiation of typhus strains by slide-agglutinative tests. *J Immunol* 50: 179-183, 1945.
- 22.- CHAN MI, McCHESNEY J and PARETSKY D. Further characterization of a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 13: 1721-1727, 1976.
- 23.- CHANDLER ASA. *Introducción a la Parasitología*. 2a Edición. Editorial Omega S.A. Barcelona, España. 1976. PP 230, 650-652.
- 24.- CHANG SHIH-MAN. A serologically-active erythrocyte-sensitizing substance from typhus rickettsiae I. Isolation and titration. *J Immunol* 70: 212-214, 1953.
- 25.- CHANG SM, SNYDER JC and MURRAY ES. A serologically active erythrocyte sensitizing substance from typhus rickettsiae II. Serological Properties. *J Immunol* 70: 215-221, 1953.
- 26.- COHEN AB, HATGI JW and WISSEMAN CL Jr. Storage stability of different antibody species against arbovirus and rickettsial antigens in blood dried on filter paper discs. *Am J Epidemiol* 89: 345-352, 1969.
- 27.- COHN ZA, BAZEMAN FM and SAWYER TK. Study on growth of rickettsiae V. Penetration of *R. tautsugamushi* into mammalian cells in vitro. *J Exp Med* 109: 271-292, 1959.
- 28.- Control de Enfermedades Transmisibles. Tifo. Secretaría de Educación Pública. México 1975. PP 398-411.
- 29.- COONS AH, SNYDER JC, CHEEVER FS and MURRAY ES. Localization of antigen in tissue cells IV. Antigens of rickettsiae and mumps virus. *J Exp Med* 91: 31-36, 1950.
- 30.- COOPER MD, HOLLINGDALE MR, VINSON JW and COSTA J. A passive hemagglutination test for diagnosis of Trench Fever due to *Babesia quintana*. *The Journal Of Infection Diseases* -- 134 (6): 605-609, 1976.
- 31.- CORY J and YUNKER CE. Rickettsial plaques in mosquito cell monolayers. *Acta Virol* 18:512-513, 1974.

- 32.- CORY J, YUNKER CE, ORMSBEE RA and TALLENT G. Plaque assay of rickettsiae in mammalian cell line. Appl Microbiol 27: 1157-1161, 1974.
- 33.- DAVIS GE and COX HR. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. Health Rep 53: 2259-2267, 1938.
- 34.- DESHAZO RD, BOYCE JH and STEPHENSON EH. Early diagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever. J Am Med Assoc 235: 1353-1355, 1976.
- 35.- ELISBER BL and BOZEMAN PM. Serological diagnosis of rickettsial diseases by indirect immunofluorescence. Arch Inst Pasteur Tunis 43: 193-204, 1966.
- 36.- ELISBER Bb, WOOD WH and BELIANTI JA. Serologic properties of immune globulins in human murine typhus (abstr). Fed Proc 29: 420, 1967.
- 37.- FISET P, ORMSBEE RA and SPIELMAN SH. A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. Acta Virol 13: 60-66, 1969.
- 38.- FISET P and SILBERMAN R. Purification des rickettsies au moyen d' échangeur d' ions. Arch Inst Pasteur Tunis 43: 231-236, 1966.
- 39.- FITSPATRICK FK. Studies on rickettsial agglutination in typhus. J Lab Clin Med 30: 577-586, 1945.
- 40.- FLORESCANO E y MALVIDO E. Ensayos sobre la historia de las epidemias en México. Tomo I y Tomo II. Ed. I.M.S.S. 1a Edición. México 1982.
- 41.- FULLER HS. Biological properties of pathogenic rickettsiae. Archives de L' Institut Pasteur de Tunis 36: 311-338, 1959.
- 42.- GAMBRILL MR and WISSEMAN CL Jr. Mechanisms of immunity in typhus infections II. Multiplication of typhus rickettsiae in human macrophage cell cultures in the nonimmune system: influence of rickettsial strains and of chloramphenicol. Infect Immun 8: 519-527, 1973.

- 43.- GAMBRILL MR and WISSEMAN CL Jr. Mechanisms of immunity in typhus infections III. Influence of human immune serum and complement on the fate of Rickettsia mooseri within human macrophages. Infect Immun 8: 631-640, 1973.
- 44.- GIMENEZ DF. Gram straining of Coxiella burnetii. J Bacteriol 90: 834-835, 1965.
- 45.- GIMENEZ DF. Coleración de las rickettsias en el saco vitelino. Comunicable Diseases Center. Atlanta 22, Georgia -- U.S.A.
- 46.- GOLDWASSER RA and SHEPARD CC. Fluorescent antibody methods in the differentiation of murine and epidemic typhus sera specificity changes resulting from previous immunization. J Immunol 82: 373-380, 1959.
- 47.- HOLLE S, DASCH GA and WEISS R. Sensitive enzyme-linked -- immunosorbent assay for detection of antibodies against -- typhus rickettsiae. Rickettsia prowazekii and Rickettsia typhi. J Clin Microbiol 6: 101-110, 1977.
- 48.- HARREL G and AIKAWA J. Pathogenesis of circulatory failure in Rocky Mountain Spotted Fever. Medicine 28: 333, 1949.
- 49.- BECHEMY KE, STEVENS RW and PHILIP RN. Discrepancies in -- Weil Felix and Microimmunofluorescence test results for Rocky Mountain Spotted Fever. J Clin Microbiol 9: 292, 1979.
- 50.- HERDMANN JE, HOLLINGDALE MR, VINSON JW and HOPPS HE. Enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation tests for the detection of antibodies to Rochalimae (Rickettsia) quintana. Proc Soc Exp Biol Med 154 (2): 285-288, Feb 1977.
- 51.- HERSEY DF and COLVIN MC. Studies of the serologic diagnosis of Murine Typhus and Rocky Mountain Spotted Fever. Trop Dis Bull 71 (3): 781-786, Aug 1974.
- 52.- HINRICHS DJ and JERRELS TR. In vitro evaluation of immunity to Coxiella burnetii. J Immunol 117: 996-1003, 1976.

- 53.- HOFFMANN S and JUSTESEN T. Effect of temperature, humidity and exposure to oxygen on the survival of anaerobic bacteria. *J Med Microbiol* 17: 609-612, 1980.
- 54.- HOLLINGDALE MR, HERRMANN JE and VINSON JW. Enzyme immunoassay of antibody to *Rochalimae quintana*: diagnosis of trench fever and serologic cross-reaction among other rickettsiae. *J Infect Dis* 137 (5): 578-582, May 1978.
- 55.- HOLLINGDALE MR, VINSON JW and HERRMANN JE. Immunochemical and biological properties of the outer membrane-associated lipopolysaccharide and protein of *Rochalimae quintana*. *J Infect Dis* 141 (5): 672-679, May 1980.
- 56.- HOPPS HE, JACKSON EB and SHADEL JE. Study on the growth of rickettsiae III. Influence of extracellular environment on the growth of *Rickettsia tsutsugamushi* in tissue culture cells. *J Immunol* 82: 161-171, 1959.
- 57.- HOPPS HE, JACKSON EB and SMADEL JE. Study on the growth of rickettsiae IV. Effect of chloramphenicol and several metabolic inhibitors on the multiplication of *Rickettsia tsutsugamushi* in tissue culture cells. *J Immunol* 82:172-181, 1959.
- 58.- HOPPS HE, KOHNA S and SMADEL JE. Production of interferon in tissue cultures infected with *Rickettsia tsutsugamushi*. (abst) *Bact Proc* 1: 115, 1964.
- 59.- HOYER BH, BOLTON ET, CRMSBEE RA, LEBOUVIER G, RITTER DG -- and LARSON CL. Mammalian viruses and rickettsiae. *Science* 127: 859-863, 1958.
- 60.- HUNTER G and FRYE W. *Manual de Medicina Tropical. Rickettsiosis. 3a Edición. Ed. Prensa Médica Mexicana. México, 1973. PP 87-96, 131-135.*

- 61.- ITO S and VINSON JW. Fine structure of *Rickettsia quintana* cultivated in vitro and in the loose. *J bacteriol* 89: 481-491, 1965.
- 62.- KAZAR J, KRAUTWURST PD and GORDON PB. Effects of interferon and interferon inducers on infections with a nonviral intracellular microorganism, *Rickettsia akari*. *Infect Immun* 3: 819-824, 1971.
- 63.- KELLY MT. Activation of guinea pig macrophages by Q fever rickettsiae. *Cell Immunol* 28: 198-205, 1977.
- 64.- KENNETH SW and ADEL APW. Tropical and geographical medicine. Rickettsial diseases. 1st Edition. Mc Graw Hill Book Company. New York, U.S.A. 1984. PP 873-885.
- 65.- KINGSBURY DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* 98: 1400-1401, 1969.
- 66.- KISHIMOTO RA, VELTRI BJ and WALKER JS. Electron microscopic study on the interaction between normal guinea pig macrophages and *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 14: 1087-1096, 1976.
- 67.- KISHIMOTO RA and WALKER JS. Interaction between *Coxiella burnetii* and guinea pig peritoneal macrophages. *Infect Immun* 14: 416-421, 1976.
- 68.- KOMORIN IN. Biological peculiarities of the development of rickettsiae. *Acta Virol* 12: 31-35, 1968.
- 69.- KORDOVA N. Plaque assay of rickettsiae. *Acta Virol* 10: 273-278, 1966.
- 70.- KORDOVA N and BREZINA R. Multiplication dynamics of phase I and II. *Coxiella burnetii* in different cell cultures. -- *Acta Virol* 7: 84-87, 1963.
- 71.- KUMATE J y GUTIERREZ G. Manual de Infectología. Rickettsiosis. 5a Edición. Editorial Hospital Infantil de México. México, 1978. PP 349-357.

- 72.- KUNO GORO. Los cultivos celulares para aislamiento e identificación de virus. Communicable Diseases Center. Atlanta 22. Georgia U.S.A. 1986.
- 73.- LENNETE EH and SCHMIDT N. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. The Rickettsiae. - 5th Edition. American Public Health Association Washington DC, U.S.A., 1975. PP 1061-1107.
- 74.- LIU WT. Trench Fever: A resume of literature and a note on some obscure phases of the disease. Chin Med J 97 (3): 179-190, Mar 1984.
- 75.- LUOTO L. A capillary agglutination test for bovine Q fever. J Immunol 71: 226-231, 1953.
- 76.- MARTINEZ BAEZ M. Manual de Parasitología Médica. Orden --- Phthiraptera o Anoplura. 2a Edición. Editorial Prensa Médica Mexicana. México, 1982. PP 374-379.
- 77.- MASON RA. Propagation and growth of Rickettsia quintana in a new liquid medium. J Bacteriol 103: 184-190, 1970.
- 78.- Mc DADE JR. Rickettsial reagents. Communicable Diseases Center. Atlanta 22. Georgia U.S.A.
- 79.- Mc DADE JR and CIRONE PJ. Plaque assay for Q fever and scrub typhus rickettsiae. Appl Microbiol 125: 961-965, 1970.
- 80.- Mc DADE JR, SHEPARD CC, REDUS MA, NEWHOUSE VF and SMITH JD. Evidence of Rickettsia prowazekii infections in the United States. Am J Trop Med Hyg 29: 277-284, 1980.
- 81.- MOOSER H and WEVER F. Experimental infection of Makakus rhesus with Rickettsia quintana. Proc Soc Exp Biol Med 83: 699, 1953.
- 82.- Morbidity and Mortality Weekly Report. Epidemic Typhus --- Georgia. Vol 33 No 43, November 2, 1984.
- 83.- MOSING GS. Critical remarks on F. Weyer research on the extracellular development of rickettsia. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 8: 110-116, 1981.

- 84.- MURPHY JR, WISSEMAN CL Jr and SNYDER LB. Plaque assay for *Rickettsia mooseri* in tissue samples. *Proc Soc Exp Biol Med* 154: 161-165, 1976.
- 85.- MURRAY SS, O'CONNOR JH and GAON JA. Serologic studies of a primary epidemic typhus and recrudescent typhus (Brill-Zinsser disease) II. Differences in immunoelectrophoretic patterns, response to 2-mercapto ethanol and relationships - to 193 and 7S antibodies. *J Immunol* 94: 734-740, 1965.
- 86.- MYERS WF, CUTLER LD and WISSEMAN CL Jr. The presence of -- diaminopimelic acid in the rickettsias. *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 459-462, 1967.
- 87.- MYERS WF, CUTLER LD and WISSEMAN CL Jr. Role of erythrocytes and serum in the nutrition of *Rickettsia quintana*. *J Bacteriol* 97: 663-666, 1969.
- 88.- MYERS WF, CUTLER LD and WISSEMAN CL Jr. Nutritional studies of *Rickettsia quintana* nature of hematin requirement. *J Bacteriol* 109: 85-95, 1972.
- 89.- MYERS WF, GROSSMAN IM and WISSEMAN CL. Antibiotic susceptibility patterns in Rochalimna *quintana*, the agent of --- Trench Fever. *Antimicrob Agents Chemother* 25 (6): 690-693, Jun 1984.
- 90.- MYERS WF and WISSEMAN CL Jr. Permeability properties of *Rickettsia mooseri*. *J Bacteriol* 93: 950-950, 1967.
- 91.- MYERS WF and WISSEMAN CL Jr. Genetics relation among the - typhus group of rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 30: 141-142, 1980.
- 92.- NEWHOUSE VF, SHEPARD CC, REDUS MD, TZIANABOS T and McDADR JE. A comparison of the Complement Fixation, Indirect Fluorescent Antibody, and Microagglutination test for the serological diagnosis of Rickettsial Diseases. *Am J Trop Med Hyg* 28: 387-395, 1979.

- 93.- OAKS SC Jr, OSTERMAN JV and HETRICE FM. Plaque assay and cloning of scrub typhus rickettsiae in irradiated L-929 cells. *J Clin Microbiol* 6: 76-80, 1977.
- 94.- ORMSBEE RA and PEACOCK MG. Rickettsial plaque assay and cloning procedures. *Tissue Culture Assoc. Manual* 2: 475-478, 1976.
- 95.- ORMSBEE RA, PEACOCK MG and WRIGHT L. Serologic diagnosis of epidemic typhus fever. *Am J Epidemiol* 105: 261-271, 1977.
- 96.- OSTERMAN JV and PARR RP. Plaque formation by *Rickettsia conorii* in WI-38, DBS-FRbL-2, L-929, HeLa and chick embryo cells. *Infect Immun* 10: 1152-1155, 1974.
- 97.- PALMER EL, TZIANABOS T and OBIJESKI JF. Electron microscopy of the cell wall of *R. prowazekii*. *J Bacteriol* 118: 1158-1166, 1974.
- 98.- PEDERSEN CE Jr, BAGLEY LR and BURGER GT. Demonstration of *Rickettsia rickettsii* in the rhesus monkey by immunofluorescence microscopy. *J Clin Microbiol* 3: 121-125, 1975.
- 99.- PEICZAR MICHAEL J Jr. *Microbiología. Capítulo 16 "Rickettsias"*. Editorial Mc Graw Hill. 2a Edición. México 1979. Páginas 249-257.
- 100.- PERKINS HR and ALLISON AC. Cell-wall constituents of rickettsiae and psittacosis-lymphogranuloma organisms. *J Gen Microbiol* 30: 469-480, 1963.
- 101.- PHILIP RN, CASPER EA and BURGENDORFER W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain Spotted Fever and typhus. *J Clin Microbiol* 3: 51-61, 1976.
- 102.- PHILIP RN, CASPER EA and VICK SA. A comparison of serologic methods for diagnosis of Rocky Mountain Spotted Fever. *Am J Epidemiol* 105: 56-67, 1977.

- 103.- PLOTZ H, BENNETT BL, WERTMAN K, SNYDER MJ and GAULD RL. Serological patterns in typhus fever I. Epidemic. Am J Hyg 49: 50-165, 1948.
- 104.- PLOTZ H, REAGAN R and WERTMAN K. Differentiation between - fevre boutonneuse and Rocky Mountain spotted fever by means of complement fixation. Proc Soc Exp Biol Med 55: 173-176, 1944.
- 105.- RAMM LE and WINKLER HH. Rickettsial hemolysis adsorption - of rickettsiae to erythrocytes effect of metabolic inhibitors upon hemolysis and adsorption. Infect Immun 95: 550, 1973.
- 106.- REILLY S. The carbon dioxide requirements of anaerobic bacteria. J Med Microbiol 13: 573-579, 1980.
- 107.- RIBI E and HOYER BH. Purification of Q fever rickettsiae - by density-gradient sedimentation. J Immunol 85: 314-318, 1960.
- 108.- RILEY HD Jr. Rickettsial diseases and Rocky Mountain spotted fever. Part II. Curr Probl Pediat 11 (6): 1-38, Apr - 1981.
- 109.- SCHAECHTER M, BOZEMAN PM and SMADELL JE. Study on the growth of rickettsiae II. Morphological observations of living rickettsiae in tissue culture cells. Virology 3: 160-172, 1957.
- 110.- SCHAECHTER M, TOUSIMIS AJ, COHN ZA, ROSEN H, CAMPBELL J -- and HAIN FE. Morphological, chemical and serological studies of cell walls of Rickettsia mooseri. J Bacteriol 74: 822-829, 1957.
- 111.- SHEPARD CC and GOLDWASSER RA. Fluorescent antibody staining as a means of detecting Rocky Mountain spotted fever - infection in individual ticks. Am J Hyg 72: 120-129, 1960.

- 112.- SHISHIDO A and HIKITA M. Study on complement fixing antigens of *Rickettsia tsutsugamushi* from tissue culture sources. *Acta Virol* 12: 53-62, 1968.
- 113.- SILBERMAN R and PISET P. Method for counting rickettsiae and chlamydiae in purified suspensions. *J Bacteriol* 95: 259-261, 1968.
- 114.- SILVERMAN DJ, BOESE JL and WISSEMAN CL Jr. Ultrastructural studies of *Rickettsia prowazekii* from louse midgut cells to feces: search for "dormant" forms. *Infect Immun* 10: 257-263, 1974.
- 115.- STORK E and WISSEMAN CL Jr. Growth of *Rickettsia prowazekii* in enucleated cells. *Infect Immun* 13: 1743-1748, 1976.
- 116.- TARASEVICH IV. Development of the theory of rickettsioses. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 3: 3-8, Mar 1979.
- 117.- TYERYAR FJ, WEISS E, MILLAR DB, BOZEMAN FM and ORMSBEE RA. DNA base composition of rickettsiae. *Science* 180: 415-417, 1973.
- 118.- TZIANABOS T. Prueba de absorción de anticuerpos para diferenciación de infecciones de tífus epidémico y murino. Communicable Diseases Center. Atlanta 22, Georgia U.S.A.
- 119.- VARELA G. Nuevas rickettsias encontradas en la República Mexicana. Fiebre Q y Fiebre de las Trincheras. *Gaceta Médica de México*. Tomo LXXXV Número 1, Marzo de 1954. México D.F. PP 275-279.
- 120.- VARELA G. Datos para la historia del tifo exantemático en México. *Memorias del Primer Coloquio Mexicano de Historia de la Ciencia*. México 1963. PP 335-343.
- 121.- VARELA G. Cinco años de experiencia en el mantenimiento de colonias de *Pediculus humanus* en el laboratorio. *Rev. Invest. Salud Pública (Méx)*. Vol XXVII Número 4, Oct-Dic de 1967. PP 317-320.

- 122.- VARELA G y BUENTELLO L. Fiebre de las Trincheras. Rev. ---
Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx). Vol XXI Número 3 y 4,
Diciembre de 1961. PP 193-199.
- 123.- VARELA G, FOURNIER R y MOOSER H. Presencia de Rickettsia -
cuintana en piojos Pediculus humanus de la Ciudad de Méxi-
co. Inoculación experimental. Rev. Inst. Salubr. Enferm. -
Trop. (Méx) 14: 39-42, 1954.
- 124.- VARELA G, VINSON JW, MOLINA PASQUEL C. Trench fever II. --
Propagation of Rickettsia cuintana on cell-free medium ---
from the blood of two patients. Am J Trop Med & Hyg 18: --
708-712, 1969.
- 125.- VINSON JW. In vitro cultivation of the rickettsial agent -
of Trench Fever. Bull WHO 35: 155-164, 1966.
- 126.- VINSON JW and CAMPDELL ES. Complement fixing antigens from
Rickettsia cuintana. Acta Virol 12: 54-57, 1968.
- 127.- VINSON JW and FULLER HS. Studies of Trench Fever I. Propa-
gation of Rickettsia-like microorganisms from a patient's
blood. Path Microbiol 24, Suppl: 152-166, 1961.
- 128.- VINSON JW y VARELA G. Nota sobre la presencia de anticuer-
nos contra el tifo en la Ciudad de México. Rev. Inst. Saly-
br. Enferm. Trop. (Méx) Vol XXII Números 3 y 4, Diciembre
de 1962. PP 203-206.
- 129.- VINSON JW, VARELA G and MOLINA-PASQUEL C. Trench Fever III.
Induction of clinical disease in volunteers inoculated ---
with Rickettsia cuintana, propagated on blood agar. Am J
Trop Med & Hyg 18: 713-722, 1969.
- 130.- WEINBERG EH, STAKEBORE JR and GERONE PJ. Plaque assay for
Rickettsia rickettsii. J Bacteriol 98: 398-402, 1969.
- 131.- WEISS E. Growth and physiology of rickettsiae. Bacteriol -
Rev 37: 259-283, 1973.

- 132.- WEISS E, DASCH GA and WOOLMAN DR. Vole agent identified as a strain of the Trench Fever rickettsia, *Rochalimaea quintana*. Infect Immun 19 (3): 1013-1020, Mar 1978.
- 133.- WEISS E and REES HR Jr. Metabolic activity of purified suspension of *Rickettsia rickettsii*. Nature 213: 1020-1022, - 1967.
- 134.- WHITE LA, HALL HE, TZIANABOS T and CHAPPEL WA. Effect of gentamicin on growth viral, chlamydial and rickettsial agents in mice and embryonated eggs. Antimicrob Agents Chemother 10: 344-346, 1976.
- 135.- WIKE DA and BURGDORFER W. Plaque formation in tissue culture by *Rickettsia rickettsii* isolated directly from whole blood and tick hemolymph. Infect Immun 6: 736-738, 1972.
- 136.- WIKE DA, ORMSBEE RA and PEACOCK MC. Effects of various suspending media on plaque formation by rickettsiae in tissue culture. Infect Immun 6: 550-556, 1972.
- 137.- WIKE DA, FALLEN G and ORMSBEE RA. Studies of the rickettsial plaque assay technique. Infect Immun 5: 715-722, 1972.
- 138.- WISSEMAN CL Jr. Interaction of rickettsiae and phagocytic host cells II. Chemotactic action of typhus rickettsiae on human polymorphonuclear leukocytes in vitro. J Immunol 87: 468-471, 1961.
- 139.- WISSEMAN CL Jr, EDLINGER ED and JONES MR. Infection cycle of *Rickettsia rickettsii* in chicken embryo and L-929 cells in culture. Infect Immun 14: 1052-1064, 1976.
- 140.- WISSEMAN CL Jr, FISET P and ORMSBEE RA. Interaction of rickettsiae and phagocytic cells V. Phagocytic and opsonic interaction of phase 1 and phase 2 Coxiella burnetii with normal and immune human leukocytes and antibodies. J Immunol 99: 669-674, 1967.

- 141.- WISSEMAN CL Jr, GAULD JR and WOOD JR. Interaction of rickettsiae and phagocytic host cells III. Opsonizing antibodies in human subjects infected with virulent or attenuated *Rickettsia prowazekii* or inoculated with killed epidemic typhus vaccine. *J Immunol* 90: 127-131, 1963.
- 142.- WISSEMAN CL Jr, GLAZIER J and GRIEVES MJ. Interaction of rickettsiae and phagocytic host cells I. In vitro studies of phagocytosis and opsonization of typhus rickettsias. *Arch Inst Pasteur Tunis* 36: 341-360, 1959.
- 143.- WISSEMAN CL Jr, JACKSON EB and SMADEL JE. Metabolic studies of rickettsiae I. The effects of antimicrobial substances and enzyme inhibitors on the oxidation of glutamate by purified rickettsiae. *J Immunol* 67: 123-136, 1951.
- 144.- WISSEMAN CL Jr and TABOR H. Interaction of rickettsiae and phagocytic host cells IV. Early cellular response of man to typhus rickettsiae as revealed by the skin window technique, with observations on in vivo phagocytosis. *J Immunol* 93: 816-825, 1964.
- 145.- WISSEMAN CL Jr and WADDELL AD. In vitro studies on rickettsia-host cell interactions: intracellular growth cycle of virulent and attenuated *Rickettsia prowazekii* in chicken embryo cells in slide chamber cultures. *Infect Immun* 11: 1391-1401, 1975.
- 146.- WISSEMAN CL Jr, WADDELL AD and SILVERMAN DJ. In vitro studies on rickettsia-host cell interactions: lag phase in intracellular growth cycle as a function of stage of growth of infecting *Rickettsia prowazekii*, with preliminary observations on inhibition of rickettsial uptake by host cell fragments. *Infect Immun* 13: 1749-1760, 1976.
- 147.- WISSEMAN CL Jr, WADDELL AD and WALSH WT. In vitro studies of antibiotics on *Rickettsia prowazekii* by two basic methods of cell culture. *J Infect Dis* 130: 564-574, 1974.

- 148.- WOODWARD TE. A historical account of the rickettsial diseases with a discussion of unsolved problems. J Inf Dis 127 (5): 583-594, 1973.
- 149.- YAMAMOTO T, KAWAMURA A and AIKAWA K. Partial purification of rickettsiae with a cation exchange resin. I Method of purification. Japan J Exp Med 28: 329-336, 1958.
- 150.- YUNKER CE. Arthropod tissue culture in the study of arboviruses and rickettsiae: A review. Curr Trop Microbiol Immunol 55: 113-126, 1971.