

# Identificación de potenciales vectores y reservorios de transmisión de *Yersinia pestis*, en zonas de alto riesgo en la región La Libertad

## Identification of potential vectors and reservoirs *Yersinia pestis* transmission in high-risk areas in the La Libertad region

Ofelia M. Córdova Paz Soldán<sup>1\*</sup> y Manuel R. Malqui Peláez<sup>2\*</sup>

Recibido: 18 de junio de 2015

Aceptado: 27 de agosto de 2015

### Resumen

La presente investigación es una contribución al estudio y caracterización de *Yersinia pestis* patógeno zoonótico con amplio rango de hospedadores y de transmisor, diversidad genética y variabilidad, por lo que se impone la necesidad de investigarlo en insectos vectores y reservorios como potenciales de transmisión de peste en la provincia de Ascope- Región La Libertad, **MATERIAL Y MÉTODO:** Estudio prospectivo, longitudinal y descriptivo, comprendido por la captura de roedores, gatos o perros utilizando trampas de metal y trampas guillotina en el intradomicilio y peridomicilio. Para la colecta de las pulgas se pasó un peine por encima del pelaje de los animales capturados. Para la caracterización molecular de *Y.pestis* se realizó la técnica de PCR utilizando cebadores *Yp11* y *Yp12* de *Yersinia*

*pestis* (GenBank: CP010294.1). **RESULTADOS:** Los hallazgos muestran a *Didelphys marsupialis*, "Zarigüeya"; *Oryzomys xantheolus* "Rata arrocerá"; *Rattus rattus* "Rata gris" y *Cavia porcellus*. *Xenopsylla cheopis*, *Pulex irritans*, *Ctenocephalides canis* y *C. felis* son los géneros de pulgas encontrados. Los ensayos de PCR realizados con el ADN total revelaron fragmentos de 148 pb. Evidencias que han demostrado el uso de PCR en la identificación de genes localizados en los plásmidos de *Y. pestis* directamente desde los animales e insectos capturados.

**Palabras claves:** *Yersinia pestis*, peste bubónica, reservorios, insecto transmisor, PCR, plásmidos

### Abstract

This research is a contribution to the study and characterization of *Yersinia pestis* zoonotic pathogen with a wide host range and transmitter, genetic diversity and variability that prevails. The need to investigate *Yersinia pestis* in insect vectors and reservoirs as potential transmission of plague in the province Ascope- Region of La Libertad, **MATERIAL AND METHOD:** A prospective, longitudinal and descriptive study comprised of catching rodents, cats or dogs using metal tramps and gu-

llotine tramps in the intradomicile and dwellings. He ran a comb for gathering fleas over the coat of trapped animals. For *Y. pestis* Molecular Characterization of the PCR was performed using primers *Yp12* *Yp11* and *Yersinia pestis* (GenBank: CP010294.1). **RESULTS** findings show *Didelphys marsupialis*, "Opossum" *Oryzomys xantheolus* "Rat Rice" *Rattus rattus* "Grey Rat" and *Cavia porcellus*. Being *Xenopsylla cheopis*, human flea, *Ctenocephalides canis* and *C. felis* flea found.

1. Microbióloga. Doctora en Biotecnología y posdoctoral en Genética Molecular,

2. Microbiólogo y estudiante de Medicina.

\* Departamento de Ciencias. Universidad Privada Antenor Orrego

PCR assays performed with total DNA revealed fragments of 148 bp. Evidence has shown that the use of PCR to identify plasmids located in *Y. pestis* directly from animals and insects captured genes.

**Key words:** *Yersinia pestis*, plague, reservoirs, transmitting insect, PCR, plasmids.

## I. INTRODUCCIÓN

La peste es una enfermedad causada por *Yersinia pestis*, patógeno zoonótico, de tipo bacilar Gram negativo, no móvil y anaerobio facultativo (1). En los humanos y roedores se comporta como una infección experimental que se adquiere por la picadura de pulgas (vector) que infectan a roedores (reservorio) y, ocasionalmente, por contacto directo con animales infectados, mordedura, arañazos o por inhalación aérea de partículas (2). Existen más de 200 especies de roedores silvestres comprometidos y más de 80 especies de pulgas como vectores de la peste (3). El amplio rango de hospedadores y de vector transmisor proporciona una gran oportunidad para la diversidad genética y la variabilidad en el genoma de *Y. pestis*. (4) Actualmente, existe una restringida diversidad genética que limita la información acerca de las propiedades genéticas y fenotípicas de *Y. pestis*. Gran parte del potencial patogénico de *Y. pestis* para los seres humanos, por lo tanto, sigue siendo desconocido, con multitud de cepas que circulan en focos naturales, muchas de las que se encuentran en regiones aisladas y que no son fácilmente accesibles a muchos investigadores. (5)

La capacidad de infectarse y de transmitirse varía sustancialmente de una especie a otro y la forma de propagación es rápida (6). En la actualidad, la peste está considerada como una de las enfermedades desatendidas en el mundo, estrechamente relacionada con la pobreza, por lo que existen compromisos globales para abordar los determinantes sociales que permiten reducir eficazmente la carga sanitaria, social y económica de este problema (7).

La peste se caracteriza por presentar tres formas clínicas: peste neumónica, bubónica y septicémica (4) con períodos de incubación de 2-3 días, y tasas de mortalidad elevadas de cerca del 100% si no se trata a tiempo (8). Los datos epidemiológicos actuales ubican al Perú como el principal afectado por la peste en América Latina y el 26% de la población de la región La Libertad (465001 hab.) habita en áreas que se encuentran en silencio epidemiológico. El 62% de la población de la provincia de Ascope (78 862 habitantes) se encuentra dentro del área de riesgo de los distritos de Casagrande y Chicama) (6) (8).

El estudio molecular de *Y. pestis* (cepa CO92) y la existencia de genomas decodificados de *Y. pestis* (Kim y 91001) ofrecen oportunidades para la comprensión de la virulencia de este patógeno. (9) En la actualidad, se han identificado algunos fragmentos de genes de *Y. pestis*, (4) y genes de virulencia presente en los plasmidos (pFra, pYV and pPst) o en el cromosoma (islas de patogenicidad), que pueden ser utilizado como diana para la identificación y caracterización de esta bacteria (10). Asimismo, el activador del plasminógeno de la proteasa (Pla) de *Y. pestis*, el cual es un determinante crítico de virulencia en la progresión de la peste bubónica y neumónica (11)

Si bien existe un gran número de estudios sobre *Yersinia*, muchos de ellos se publican en revistas de lengua rusa, situación que dificulta tener un mayor conocimiento acerca de la diversidad fenotípica, genética y natural de *Y. pestis*, por lo que urge la necesidad de incrementar estos tipos de estudios, utilizar técnicas moleculares, cuyas ventajas son mayores con respecto a los métodos convencionales, sobre todo en casos en que el número de bacterias presentes es pequeña o cuando la enfermedad aún no ha sido declarada y obtener una comprensión más completa de la variedad de cepas de *Y. pestis* que se puede encontrar en el mundo. (4)

La presencia de la enfermedad a lo largo del tiempo hace que sea necesario investigar *Yersinia pestis* en insectos vectores y reservorios, a fin de detectar los potenciales de transmisión, identificar la dinámica de transmisión, disminuir la magnitud de la peste bubónica en las áreas de alto riesgo de esta peste como la provincia de Ascope - región La Libertad, una estrategia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Gerencia de Salud (GERESA) de La Libertad.

## II. MATERIAL Y MÉTODO

- **Población:** Compreendida por los insectos transmisores, roedores, gatos o perros que habitan en la zona de Mocan en el distrito de Casagrande. Provincia de Chicama - región la Libertad.
- **Muestra:** Compreendida por las pulgas y roedores, gatos o perros hallados en las zonas de estudio.
- **Unidad de análisis:** Compreendida por los aislados de *Yersinia pestis* de las muestras biológicas

## MÉTODO

El diseño de investigación ha sido de tipo prospectivo, longitudinal y básico-descriptivo. El diseño metodológico estuvo comprendido por:

• **Obtención de la muestra de estudio:** La captura de roedores, gatos o perros se realizó utilizando trampas de metal para el caso de roedores vivos y trampas guillotina en caso de roedores muertos, trampas que fueron colocadas en el intradomicilio y peridomicilio al atardecer y recogidas al amanecer (9).

La colecta de los insectos transmisores (pulgas) se obtuvo pasando un peine por encima del pelaje de los roedores, gatos o perros capturados. (12)

• **Obtención de *Yersinia pestis*** de los roedores, gatos o perros capturados en la zona de estudio y que mostraron niveles elevados de seroconversión del título de inmunoglobulina anti-F1 (Ig G) por la técnica de ELISA. (13)

Para la caracterización molecular se realizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la Polimerasa) utilizando cebadores (o primer) específicos para la identificación del genotipo de *Y. pestis* (10) previa extracción de ADN plasmídico usando el kit comercial Qiamp Tissue Kit (QIAGEN) y de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. ADN (4) (5). Los cebadores u oligonucleótidos utilizados fueron los correspondientes al plásmido pPCP, aislado de *Yersinia pestis* cepa Nairobi, secuencia completa del GenBank: CP010294.1

*Yp12*: F: 5'- CTA TGC CAT ATA TTG GAC TTG C-3'  
y R: 5'-GCA AGT CCA ATA TAT GGC ATA G-3'

*Yp11*: F: 5'- GAG CCG GAT GTC TTC TCA CGA-3'  
y R: 5'- CTC TGC CAT TTG GAC TTG GGC-3'

La mezcla de la reacción fue de 25 µl conteniendo 50 mM KCl; 10 mM Tris -HCl (pH 8,0); MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,001 % de gelatina; 200 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 20 pmol de cada cebador iniciador; 1 U de Taq ADN polimerasa. Y las condiciones de amplificación se realizaron en un termociclador programado para 35 ciclos de 1 minuto a 94 ° C, 2 minutos a 50 ° C, 2 minutos a 72 ° C y una etapa final de 5 minutos a 72° C. (10)

Para el análisis de los patrones de bandas después de la amplificación 5 ul de los productos amplificados, estos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE, bajo tensión constante de 100 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo la luz ultravioleta (UV). Los patrones producidos fueron comparados mediante el coeficiente de correlación de Pearson, en el que se considera el número de bandas y su intensidad. Con una tolerancia de 1,2% en la posición de las bandas.

### III. RESULTADOS

#### a) Obtención de la muestra de estudio



Fig 1. Condiciones ecológicas del área de estudio. Mocan - Casagrande. Provincia de Ascope

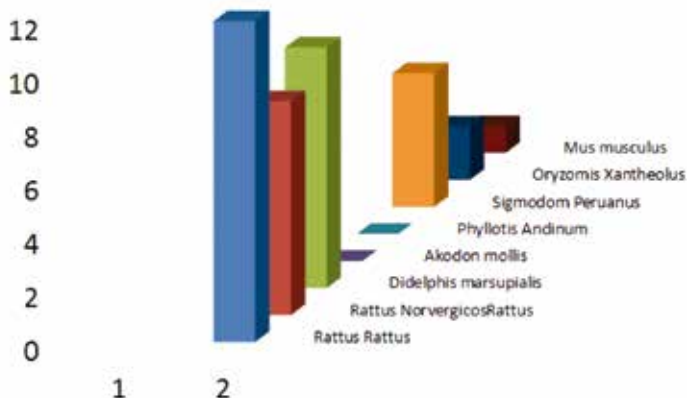


Fig 2. Condiciones epidemiológicas de peste bubónica en el área de estudio. Mocan - Casagrande. Provincia de Ascope

**Captura de roedores, gatos o perros**

Los hallazgos muestran *Didelphys marsupialis*, “Zarigüeya” o “Hurón”, *Oryzomys xantheolus* “Rata Arrocera” *Rattus rattus* “Rata Techera” o “Rata Gris”, *Akodon mollis* y *Phyllotis andinum.*, *Cavia porcellus* que pueden verse afectados cuando los roedores sinantrópicos (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*) están infectados.

Fig 4. Distribución de ectoparásitos según especies de mamíferos, en Mocan-Casagrande. Provincia de Ascope



### Caracterización molecular de *Yersinia pestis* aislados

Los ensayos de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) realizados con el ADN total aislado de los perros, gatos o roedores con títulos de seroconversión anti *Yersinia pestis* altos, revelaron fragmentos de ADN de 148 pares de bases (pb) que corresponden a la secuencia amplificadora de *Yp12*: Plásmido PCP de *Y. pestis* cepa Nairobi ( Fig 5 al 8)

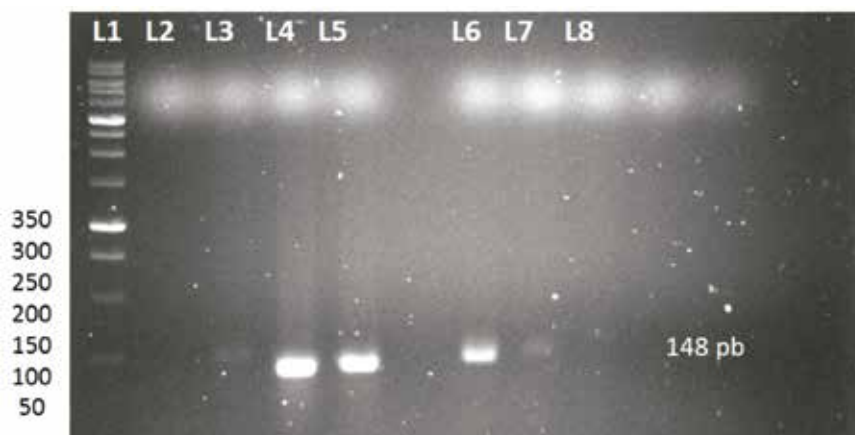


Fig. 5 - Productos de amplificación del ensayo de PCR Línea 1: ladder, línea 3: ADN purificado de *Didelphys marsupialis*, línea 4: ADN purificado de *Oryzomys xantheolus*, línea 5: ADN purificado de *Rattus rattus*, línea 6: ADN purificado de *Akodon mollis*, línea 7: ADN purificado de *Phyllotis andinum*, línea 8: Control.

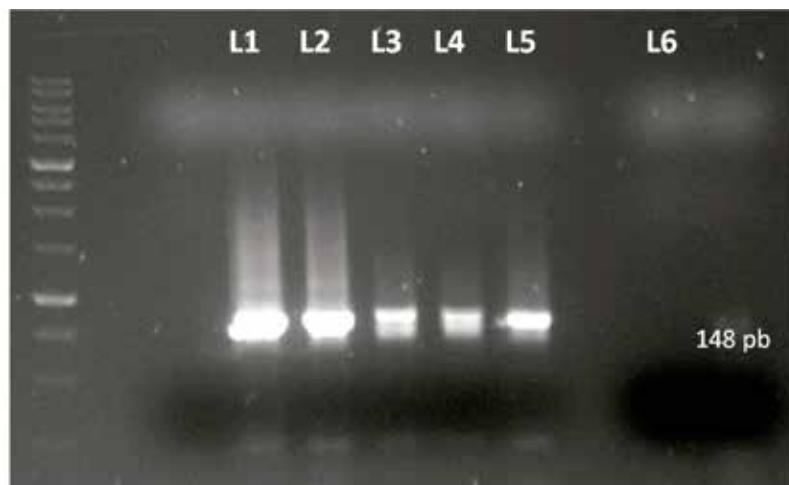


Fig 6. Ensayos de optimización mostrando las diluciones del AND plasmídico ara la PCR: 20 ng (Línea 1); 0.2 ng (Línea 2); 0.02 ng (Línea 3); 2 pg (Línea 4); 0.2 pg (Línea 5); control (línea 6).

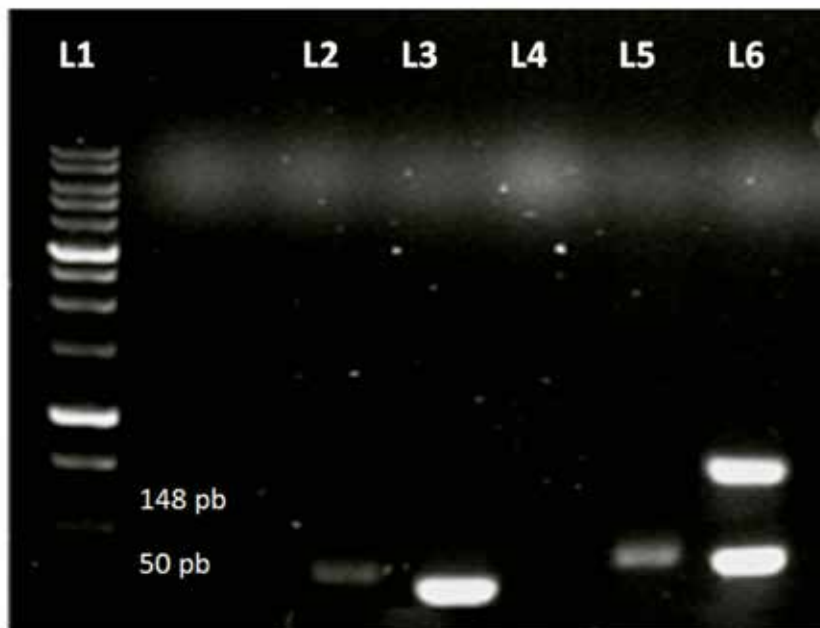


Fig. 7 - Productos de amplificación del ensayo de PCR. Línea 1: ladder, línea 2: ADN purificado de *B. thuringensis*; línea 3: ADN purificado de *E. coli*, línea 4: Control, línea 5: ADN purificado de *T. cruzi*, línea 6: ADN purificado de probable *Yersinia*,

#### IV. DISCUSIÓN

Los datos de morbilidad y mortalidad de la peste observados en el año 2010 dan énfasis al estudio en Mocan (Fig 1) del distrito de Casagrande - Provincia de Ascope, en el que se evidencia la circulación de *Yersinia pestis* (12). Un análisis de los últimos brotes de peste registrados en la sierra del Perú muestra características epidemiológicas como las modificaciones del medio ecológico en los brotes ocurrido en los años 1983 y 1992, comunes a los observados en las localidades en estudio (fig 2). Estas características favorecen el incremento de reservorios de la enfermedad y su desplazamiento hacia las viviendas, así como también el incremento de pulgas; la crianza de cuyes dentro de las viviendas; el inadecuado almacenamiento de alimentos y cosechas; la precariedad y hacinamiento en las viviendas. (12)

La tenencia de animales de compañía estrecha la relación entre el hombre y los perros, gatos o cuyes y sus pulgas, con métodos inapropiados de convivencia. Las pulgas son los artrópodos parásitos que ocupan un rol especial en la salud pública. Las pulgas no solo causan daños directos en el animal, sino

que además participan como hospedadores intermediarios (Fig 4) que afectan tanto a los reservorios como al hombre. De las seis especies domésticas como *Ctenocephalides felis* o *Ctenocephalides canis*, que también afectan normalmente al hombre, existe referencia de las pulgas de la rata del norte (*Nosopsyllus fasciatus*) y de la pulga de la rata oriental (*Xenopsylla cheopis*), las que al alimentarse de la sangre de los animales sobre los que viven ayudan a la supervivencia de los agentes zoonóticos como *Yersinia pestis*. (15)

Los recientes cambios en las prácticas agrícolas, el incremento de los animales, los alimentos, las personas y el calentamiento global crean entornos que facilitan la rápida y amplia difusión de patógenos zoonóticos. (16) La diversidad de *Yersinia*, microorganismo con alto potencial patogénico para los seres humanos, es esencial investigarla genética y fenotípicamente para entender el impacto de su variación en la patogénesis, diagnóstico y tratamiento.

Los procedimientos basados en PCR han permitido la identificación de *Y. pestis* en diversas muestras biológicas: pulgas infectadas experimentalmente, ratones y cultivos bacte-

rianos de *Y. pestis*. (10) (12) (4) Procedimientos rápidos y sencillos dirigidos a la identificación de genes localizados en los plásmidos de *Y. pestis* directamente desde roedores, perros, gatos o pulgas capturadas. Los geles de electroforesis que muestran los amplificadores de primer de *Yersinia* en roedores (fig 5) sugieren la existencia de *Y. pestis* en roedores, debido posiblemente a la circulación enzoótica de *Y. pestis* en focos de peste que requiere infección activa en un entorno natural. Por otro lado, la adaptación para la transmisión continua de *Yersinia* dentro de las diferentes especies de roedores puede contribuir en gran medida a la aparición de variantes subespecies *Y. pestis*, que se diferencian por los requerimientos nutricionales y su capacidad de causar bacteremia y muerte en diferentes especies animales (1) (12)(15).

Los geles de electroforesis NO mostrando amplificadores de primer de *Yersinia* en pulgas (fig 8) sugieren la inexistencia de *Y. pestis* en el vector

transmisor y esto debido probablemente a la ausencia de focos de plagas conectados geográficamente, condicionante de considerables diferencias ecológicas necesarias para la supervivencia de *Y. pestis* y el poder ser transmitida en estos entornos. Esto ha dado lugar a una considerable diversidad en el genotipo y el fenotipo entre brotes de diferentes focos naturales. (17)

La variabilidad de especies está estrechamente relacionada con el potencial patogénico de estas cepas y puede ser grande, incluso para las cepas de la misma subespecie. Por lo tanto, aunque puede haber considerable homogeneidad de diferentes aislados *Y. pestis* que circulan dentro de un enfoque natural de la infección, se ha observado dentro de esta variabilidad de especie, cepas avirulentas circulando en una misma región geográfica. Heterogeneidad intraespecífica en la virulencia, la especificidad del hospedador, características fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas. (18)

## V. CONCLUSIONES

Se ha identificado *Rattus rattus* y *Didelphis marsupial* como los roedores y a *Xenopsilla cheopis* como la pulga más común en la zona de estudio.

Se ha optimizado el hallazgo de *Yersinia* en los roedores capturados compatible con los cebadores iniciadores *Yp 11* y *Yp12*. Cebadores que conservan especificidad después de las condiciones de amplificación y la formulación de mezcla de reacción, ADN molde y los controles positivos. Y sensibilidad permitiendo alguna flexibilidad cuando se usa el ensayo en otros entornos de laboratorio.

## VI. AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al FAIN organizado por la Dirección de Investigación, por su apoyo económico y logístico en el desarrollo del presente proyecto.

Al microbiólogo Oscar Díaz Mendo, jefe del centro de salud Ascope por el apoyo brindado, el mismo que permitió realizar el presente estudio.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yersinia infection tools-charact... [Front Cell Infect Microbiol. 2012] - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 24 de junio de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316485>
2. Castañeda A, et al. Peste Neumónica Primaria con transmisión Intrahospitalaria en La Libertad, Perú 2010. RevPeruMedExp Salud Pública. 2010; 27(3): 326-36.
3. Sánchez-Carlos E. La Muerte Negra, "El avance de la Peste". Revista Fac. Med. 2008; 16(1): 133-135. Pachas P, Mendoza L, González D, Fernández V, Céspedes M. Control de la Peste en la Libertad, Perú. RevPeruMedExp Salud Pública. 2010; 27(3): 473-77.
4. Lopez Caroline, Stephanie Herwegh, Frederic Wallet, Sylvie Armand. Detection of *Yersinia pestis* in Sputum by Real-Time PCR. 2003 Journal of Clinical Microbiology, 41 (10): 4873–4875.
5. Eppinger M, Radnedge L, Andersen G, Vietri N, Severson G, et al. (2012) Novel Plasmids and Resistance Phenotypes in *Yersinia pestis*: Unique Plasmid Inventory of Strain Java 9 Mediates High Levels of Arsenic Resistance. PLoS ONE 7(3): 32911-10.1371
6. Gerencia Regional de Salud La Libertad - Oficina de Epidemiología. 2009. Informe de brote de Peste en Ascope
7. OPS/OMS oCD, 61.a SESIÓN DEL COMITÉ REGIONAL. Resolución, CD49. R19, Eliminación de las enfermedades desatendidas y otras infecciones relacionadas con la pobreza. Washington, D.C., EUA, del 28 de septiembre al 2 de octubre del 2009,2009
8. Maguiña C. Actualización sobre peste en el Perú. Rev Per GinecolObstet. 2010; 56: 238-241. Yersinia--flea interactions and the evol... [Curr Opin Microbiol. 2012] - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 24 de junio de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406208>
9. VirojWiwanitkit. Swine flu infection among medical students: An issue of concern. Am J Infect Control. 2009; 37(10): 868.
10. Nilma C. Leal y Alzira M. P. de Almeida. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 41 (6): 339-342, November-December, 1999
11. Substrates of the plasminogen activator pro... [Adv Exp Med Biol. 2012] - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 24 de junio de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782771>
12. Organización Panamericana de la Salud. Informe de Reunión Internacional de Expertos sobre Peste en América Latina 22 a 24 de enero del 2013 Lima, Perú.
13. Seraylán S and Vargas L. Purificación y control de calidad de la fracción antigénica F1 de *Yersinia pestis*. Rev Med Exp 1999, XV (1-2)
14. Donaires L, Céspedes M, Valencia P, Salas J, Luna M, Castañeda A, et al. Peste Neumónica Primaria con transmisión Intrahospitalaria en La Libertad, Perú 2010. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(3): 326-36.
15. Arrieta M, Soto R, Gonzáles R, Nombera J, Holguín C, Monje J. Características de la población de roedores y pulgas en áreas de diferente riesgo para peste de tres provincias del departamento de Piura-Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2001; 18(3-4): 90-97.
16. Gajadhar, W.B. Scandrett., L.B. Forbes. Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. Centre for Foodborne & Animal Parasitology, Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon Laboratory, Saskatchewan S7N



2R3, Canada. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,2006, 25 (2), 595-606

17. M. I.Levi, Abstr. Sci. Conf. Natur. Focalidad Prophyl. Plaga tularemia,p. 72-74, 1962; F. Zhenya, Z. Xiang, L. Yunheng, L.Junio, W. Shenrong, Z. Yaoxing, J. Lingling, y L. Feng, Abstr. Séptimo Int. Symp. Yersinia, abstr. P-127, Med. Microbiol. [Ned. N. Voor] 6 [Suppl. II]: S42, 1998).
18. Andrey P. Anisimov, Luther E. Lindler and Gerald B. Pier. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. Clinical Microbiology Reviews. 2004. 17(2): 434–464)