

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estimación de la confiabilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar infección por *Rickettsia* spp. y *Rickettsia rickettsii* en pacientes del estado de Sonora



**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias de la Salud**

Presenta

**Marcia Leyva Gastélum**

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2018

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Agradezco todo el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para hacer realidad este proyecto de investigación, que desde su inicio aportó resultados importantes para los pacientes con FMMR en Sonora y con el cual obtengo el grado de Maestra en Ciencias.

Gracias CONACYT por impulsar nuevas estrategias de ciencia, tecnología e innovación para nuestro país.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al culminar este proyecto que iniciamos hace algunos años, en los que siempre conté con su apoyo, confianza, tiempo, conocimiento, empatía y gran compromiso, quiero agradecerles a mi Director y comité de tesis por ser mis guías en este camino, siempre tendrán mi admiración, respeto y cariño.

Gracias por ser un ejemplo y una inspiración para mí.

A la Universidad de Sonora que me ha brindado desde la licenciatura, las posibilidades de crecer y al Programa de Maestría en Ciencia de la Salud, que me ha otorgado su apoyo en todo momento.

Agradezco también a la secretaría de salud y el Laboratorio Estatal de Salud Pública que son fundamentales en mi formación profesional, por el tiempo y la ayuda otorgada en el desarrollo del proyecto de investigación.

Gracias a mi familia, a mi esposo y mis hijas, que siempre están conmigo, acompañándome, creyendo en mí y siendo el motivo para esforzarme en ser una mejor versión de mí, en cada una de las facetas de mi vida, muchas gracias siempre.

## INDICE

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>OBJETIVOS</b> .....	ix
Objetivo General.....	ix
Objetivos Específicos.....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Planteamiento del Problema.....	3
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	6
Fiebre Manchada por <i>R. rickettsii</i> : Significancia e Impacto en la Salud Pública en México.....	6
Métodos de Laboratorio Para el Diagnóstico de <i>Rickettsia rickettsii</i> .....	6
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	6
Cultivo.....	7
Inmunohistoquímica.....	8
Métodos de Laboratorio Para el Diagnóstico de Rickettsiosis.....	8
Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	8
Weil-Félix.....	9
Inmunocromatografía.....	9
Sistemas de Puntuación.....	10
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	11
Generalidades.....	11
a) Sitio y Sujetos de Estudio.....	11
b) Tipo y Tamaño de Muestra.....	11
c) Procedimientos de Recolección de datos.....	12
d) Procedimientos de Recolección de las Muestras Biológicas.....	12

e) Procedimientos Técnicos.....	13
f) Plan de análisis.....	19
g) Consideraciones éticas.....	21
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
Primera Etapa o de Estandarización.....	23
Coeficiente kappa.....	23
Segunda Etapa.....	25
Coeficiente kappa.....	25
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
Recomendaciones Metodológicas.....	40
Recomendaciones de Investigación.....	40
Recomendaciones de políticas públicas.....	41
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>43</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>49</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	Objetivos de amplificación de las técnicas comparadas para evaluar la confiabilidad de PCR convencional para el diagnóstico de <i>Rickettsi rickettsii</i> , con las secuencias de iniciadores y sondas.....	<b>20</b>
<b>II</b>	Resultados en muestras sanguíneas para <i>R. rickettsii</i> en los laboratorios de prueba.....	<b>24</b>
<b>III</b>	Resultados en muestras sanguíneas para <i>Rickettsia</i> spp. en los laboratorios de prueba.....	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Estudio epidemiológico de enfermedades transmitidas por vectores.....	<b>13, 14</b>
<b>2</b>	Distribución proporcional de resultados positivos y negativos de PCR para <i>R. rickettsii</i> en muestras de sangre total y suero (n= 51), con una p<0.05.....	<b>26</b>
<b>3</b>	Distribución proporcional de resultados positivos y negativos de PCR para <i>R. rickettsii</i> en muestras de sangre total (n=60) y suero (n=47) de pacientes pediátricos, con una p<0.05.....	<b>26</b>
<b>4</b>	Días desde el inicio de síntomas hasta la toma de muestra en pacientes positivos para <i>R. rickettsii</i> por PCR convencional (n=165).....	<b>30</b>
<b>5</b>	Distribución proporcional de resultados positivos y negativos en muestras sanguíneas (n=392) y suero (n=28) para <i>R. rickettsii</i> en PCR convencional durante los años 2016-2017...	<b>30</b>
<b>6</b>	Distribución proporcional de resultados en pacientes pediátricos (n=185) y adultos (n=235) para <i>R. rickettsii</i> en PCR convencional en los años 2016-2017.....	<b>31</b>
<b>7</b>	Días desde el inicio de síntomas hasta la toma de muestra de pacientes positivos y negativos, en proporción con el total de muestras para diagnóstico de <i>R. rickettsii</i> por PCR (n=455).....	<b>33</b>



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estimar la confiabilidad de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, en muestras sanguíneas de pacientes con sospecha de infección por la bacteria *Rickettsia rickettsii*, atendidos en hospitales públicos del estado de Sonora, durante el período comprendido entre el 1º de Enero de 2016 y el 30 de junio de 2017, comparando los resultados obtenidos con PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR).

### **Objetivos Específicos**

- a) Identificar clínicamente e integrar dos grupos de pacientes entre la población que solicita atención en hospitales del sector público del estado de Sonora: Grupo I con pacientes con diagnóstico clínico de fiebre manchada; Grupo II con pacientes con síndrome febril agudo, pero sin sospecha clínica de fiebre manchada.
- b) Estimar la confiabilidad de la técnica PCR, contrastándola con el método de qPCR.

## RESUMEN

La fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR) es una enfermedad que se transmite en México por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus (sensu lato)*, que es un problema de salud pública en Sonora. Las complicaciones clínicas pueden evitarse si se diagnostican y tratan de inmediato, ya que los casos tardíos pueden tener resultados fatales.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado una buena capacidad de diagnóstico a nivel experimental, por lo que evaluamos su desempeño en muestras de sangre a nivel de población, en un área endémica como Sonora. Hicimos el diagnóstico en muestras de sangre total y suero (cuando fue posible), en diferentes días de evolución de la enfermedad de pacientes clínicamente sospechosos, de hospitales públicos de Sonora, identificando mediante PCR en el punto final dos genes: el gen *gltA* para el género *Rickettsia*, con un producto de 401 pares de bases y el A1G\_04230 para la especie *rickettsii*, con un producto de 153 pares de bases.

Los resultados observados se compararon con la PCR en tiempo real de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), comparando 172 muestras, obteniendo un coeficiente kappa = 0.78 y comparando con el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), un total de 443 muestras, obtuvimos un coeficiente de kappa = 0.9. En la comparación de sangre total y suero, se buscó una asociación por Chi cuadrado, y se encontró una significación estadística del 0,05%. Los resultados positivos de la PCR en muestras de sangre total y suero se encuentran en los días 1 a 15 de la evolución de la enfermedad, pero en los casos de pacientes con más de un día de tratamiento con doxiciclina, los resultados pueden ser negativos.

## INTRODUCCIÓN

La fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR), es una enfermedad infecciosa, aguda y potencialmente mortal. Su nombre se debe a Howard Taylor Ricketts, quien en 1909 identificó a la bacteria como el agente causal de la enfermedad y tres años antes había evidenciado a la garrapata como el vector de este padecimiento. En 1919 Wolbach la nombró *Dermacentroxenus rickettsii* y en 1922 Brumpt le asignó y se aprobó el nombre de *Rickettsia rickettsii*. (GBIF, 2017). En 1943 se aisló por primera vez en México por Bustamante, Ortiz y Varela quienes identificaron como vector a la garrapata común al perro (*Rhipicephalus sanguineus sensus lato*); todas las infecciones rickettsiales se clasifican como zoonosis, una infección de los animales que puede ser transmitida a los humanos a través de un vector (Biggs, 2016). La FMRR es transmitida en el país por la mordedura de la garrapata *R. sanguineus* que parece ser el principal vector de la enfermedad en México, en Sudamérica también se encuentra en roedores como los capibaras y zarigüeyas (Eremeeva, 2011).

*R. sanguineus* puede ser infectada y a su vez, transmitir infección de bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Orientia*, que son morfológicamente y bioquímicamente similares a otras bacterias gramnegativas. Estos son microorganismos fastidiosos, intracelulares obligados, cocobacilos cortos de 0.8 a 2 $\mu$  de longitud y de 0.3 a 0.5 $\mu$  de diámetro. El orden *Rickettsiales* históricamente ha sido dividido en tres familias: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* y *Anaplasmataceae* (Biggs, 2016, Paddock, 2017). El género *Rickettsia* está dividido en dos grupos: Fiebres Tíficas y Fiebres Manchadas, este último grupo está conformado por *R. conorii*, *africae*, *parkeri*, *helvética*, *honei*, *massilae*, *felis*, *slovaca*, *acari*, *sibirica*, *riphicephali*, *heilongiangensis*, *montanensis*, *peacockii*, *philipi*, *endosymbiont*, y *rickettsii* (Eremeeva, 2011; Sahni, 2013).

*R. rickettsii*, es la especie de mayor virulencia, aunque se reconoce que existe variabilidad en la evolución clínica de la infección aún dentro de la misma especie *rickettsii*. Esta variabilidad ha sido demostrada en las diez cepas secuenciadas de la bacteria *R. rickettsii* (Número de acceso a GenBank indicado entre paréntesis): *R. rickettsii* Iowa (CP000766.3), Hino (CP003309.1) Hauke (CP003318.1), Arizona (CP003307.1), Brasil (CP003305.1), Colombia (CP003306.1), Sheila Smith (CP000848.1), Hlp#2 (CP003311.1), Morgan (CP006010.1), y R (CP006009.1) que fueron comparadas por su virulencia, de acuerdo a factores como áreas de adhesión, genómica, proteómica, metabolómica, filogenética, tropismo y respuesta inmunológica propias del huésped (Fournier, 2009, Fournier, 2009; Uchiyama, 2012; Sahni, 2013; Clark, 2015).

La infección por *R. rickettsii* puede provocar una enfermedad moderada o grave y mortal, por infección sistémica en el humano, debido al daño de células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos, afectando tejidos y distintos órganos. En cuadros severos, el daño es irreversible en el endotelio, dermis, pulmones, corazón, riñones, tracto gastrointestinal, cerebro, esqueleto, músculos y otros sitios, lo que puede explicar las manifestaciones clínicas graves que ocurren en los pacientes, lo que usualmente está relacionado con retraso en el tratamiento farmacológico de la enfermedad (Masters, 2003; Ellison, 2008; Walker, 2008).

El daño al endotelio vascular es el principal responsable del exantema, el dolor de cabeza, malestar general y síntomas gastrointestinales, comúnmente asociados a la FMRR, y puede conducir a manifestaciones más severas como necrosis, hemorragia pulmonar y edema, disnea, miocarditis, falla renal y hepática agudas, meningoencefalitis y muerte cerebral. La necrosis puede provocar daños irreversibles como amputaciones digitales, de miembros inferiores, pabellones auriculares, entre otras. *R. rickettsii* puede provocar estos

resultados fatales de no iniciar el tratamiento durante los 3 primeros días de inicio de síntomas (Dumler, 2005; Oteo, 2014).

### **Planteamiento del Problema**

La FMRR es un problema de salud pública en el estado de Sonora por la letalidad y complicaciones asociadas a su ocurrencia. La enfermedad reapareció en el estado desde el inicio de la década del 2000, y cada año ocurren en promedio unos 150 casos nuevos y fallece entre 30 y 40% de los pacientes enfermos. Su letalidad puede prevenirse si se sospecha tempranamente y se comienza el tratamiento antibiótico específico con doxiciclina (Álvarez-Hernández, 2015; Biggs, 2016; Paddock, 2017).

No obstante, alcanzar tal propósito es difícil, primero porque el inicio sintomático de la enfermedad es poco específico y semeja a diversos padecimientos; y segundo, porque el diagnóstico se corrobora mediante la detección de anticuerpos IgG por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en muestras pareadas tomadas entre los días 7-10 después de iniciados los síntomas. Debe tomarse una segunda muestra durante los días 20-22 y los títulos de anticuerpos deben cuadruplicar al inicial, para confirmar la positividad (La Scola, 1997). Cuando la FMRR se encuentra en etapa avanzada, el exantema petequial es extenso y hay evidente daño multiorgánico como falla hepática aguda, insuficiencia renal aguda, deterioro neurológico y respiratorio, que se asocia a una mayor proporción de resultados fatales y complicaciones en los sobrevivientes. (Álvarez, 2017; Delgado-de la Mora, 2017)

La prueba de IFI tiene valor clínico limitado, dado que la respuesta inmune no es detectable mediante este método sino hasta la segunda semana de evolución, y una nueva determinación en suero debe realizarse dos semanas después de la primera toma de muestra. Un resultado negativo en la

prueba no descarta el diagnóstico pues diversos factores como la inmunosupresión y la terapia temprana con fármacos de la clase de las tetraciclinas, cefalosporinas y fluoroquinolonas pueden disminuir o retrasar el desarrollo de anticuerpos, por lo tanto, producir resultados erróneos (La Scola, 1997; Biggs, 2016).

Un factor que dificulta el diagnóstico de la FMRR es que no hay disponibilidad de pruebas de laboratorio rápidas y válidas para corroborar la infección. Por tal razón, aunque IFI es un método que provee información útil para confirmar el diagnóstico y contribuye a entender el comportamiento epidemiológico y sanitario de la FMRR, posee limitaciones para propósitos médicos, pues poco contribuye para la sospecha temprana y tratamiento de la enfermedad antes de su etapa crítica (La Scola, 1997; Oteo, 2014). Esto es importante porque un reporte señaló que hasta 37% de niños y adolescentes hospitalizados en Sonora por cuadros clínicos altamente compatibles con la infección, no se confirmaron con IFI debido a que la mitad de ellos falleció en los primeros 5 días de comenzado su padecimiento. (Álvarez-Hernández, 2015)

Por ello, en Sonora es necesario examinar el valor clínico de métodos diagnósticos alternativos, cuya utilidad a nivel experimental ha sido probada, además de que sus resultados se obtienen en menor tiempo que los de IFI, pero cuya confiabilidad a nivel poblacional es aún incierta. Uno de tales métodos es la amplificación de secuencias específicas de ADN mediante la PCR, que está disponible en algunos centros de investigación en Estados Unidos y Latinoamérica, pero no comercialmente y cuyo valor clínico para el diagnóstico de FMRR a nivel poblacional no ha sido documentado, aunque en otras infecciones rickettsiales (p.e. *Ehrlichia chafeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*) tiene una sensibilidad entre 52 y 87% (La Scola, 1997; Oteo, 2014; Biggs, 2016).

La técnica de qPCR se ha utilizado para el diagnóstico de *Rickettsia* en países como Estados Unidos (Sexton, 1994), Brasil (Rogental, 2006), Panamá (Estrpeaut, 2007), Costa Rica (Arguello, 2012) y México (Zavala-Castro, 2008; Labruna, 2004), aunque en ninguno de ellos se evaluó específicamente la confiabilidad clínica del método a nivel de poblacional. En la identificación de la especie *rickettsii* se evaluó por qPCR en los Centros de diagnóstico y control de enfermedades de Estados Unidos (CDC), en muestras clínicas con distintas especies de *Rickettsia*, enterobacterias, hongos y otras enfermedades febriles exantemáticas, comprobando la especificidad del gen que identifica a la especie *rickettsii*, esto sólo con cepas de referencia (Kato, 2013)

## ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### **Fiebre Manchada por *R. rickettsii*: Significancia e Impacto en la Salud Pública en México**

La FMRR es una enfermedad reemergente en varias partes de México como Coahuila, en donde utilizando la prueba de aglutinación Proteus Ox19 o prueba de Weil Félix se confirmó a 115 niños y adolescentes, con una mortalidad del 55% (De Lara-Huerta, 2008); en Yucatán(Zavala-Castro, 2008) se documentaron nueve casos confirmados y 33% de mortalidad, diagnosticados por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); en Baja California, se confirmaron 278 casos por ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas [ELISA] (SINAVE, 2010; Field, 2011).

En Sonora se documentó su presencia desde comienzo de la década del 2000, un estudio describió 18 casos confirmados por IFI, con una letalidad de 33% (Álvarez-Hernández, 2013); otro estudio dio cuenta de 104 pacientes pediátricos que ocurrieron entre 2004 y 2013, con una letalidad de 20.2% (Álvarez-Hernández, 2015). Tales reportes sólo incluyeron casos confirmados por laboratorio, pero adicionales casos con cuadro clínico compatible de FMRR no fueron confirmados por IFI, pues no fue posible analizar una segunda muestra, ya sea por defunción o recuperación del paciente.

### **Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de *Rickettsia rickettsii***

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Las técnicas de PCR constituyen un método útil para la identificación del agente infeccioso por medio de la amplificación del ADN específico de género y especie por métodos convencionales, o en tiempo real, e incluso con PCR multiplex en tiempo real para identificar distintas especies de *Rickettsia*



(Denison, 2014). Cualquiera de los 3 métodos inicia con la extracción del ADN en muestras de sangre total, obtenida durante los primeros 7 días de la enfermedad, pues el número de bacterias circulantes disminuye durante la etapa de convalecencia; en esta etapa, las biopsias de tejido cuentan con más ADN por el tropismo natural de la enfermedad por lo que sería la muestra de elección; debe considerarse cuidadosamente, que el tratamiento con doxiciclina disminuye la sensibilidad de la PCR en algunas enfermedades transmitidas por garrapatas, por lo tanto, la toma de muestra de sangre para pruebas moleculares debe hacerse antes de iniciar el tratamiento para minimizar la probabilidad de un resultado falso negativo (Dumler, 2007; Biggs, 2016).

### **Cultivo**

El cultivo es la prueba de referencia o estándar de oro. Además, resulta fundamental para la obtención de antígenos y para estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos. En este sentido, cuando se pretende cultivar una nueva especie de *Rickettsia*, las líneas celulares más utilizadas son las VERO-E6 (ATCC CCL- 81), fibroblastos L929 y también diferentes líneas celulares derivadas de artrópodos.

No obstante que es la prueba de referencia, el aislamiento de *Rickettsias* mediante cultivo celular convencional a partir de una muestra procedente de un paciente con rickettsiosis, es un proceso muy laborioso y solamente realizado en laboratorios de bioseguridad 3, en los que se recomienda equipamiento especial y personal altamente entrenado. En la actualidad, el cultivo debe complementarse con técnicas moleculares para determinar específicamente la especie de *Rickettsia* aislada (RICCER, 2014; Biggs, 2016). Del mismo modo que con PCR, la capacidad diagnóstica del cultivo disminuye si las muestras se han obtenido una vez iniciado el tratamiento antimicrobiano.

## **Inmunohistoquímica**

Para pacientes con erupción cutánea o escara, la tinción inmunohistoquímica (IHQ) en biopsia de piel es una técnica de diagnóstico útil para Rickettsiosis. La técnica usa anticuerpos monoclonales o policlonales para identificar diversas especies, en biopsias fijadas en formol, biopsias embebidas en parafina o especímenes de tejido de autopsia. La IHQ aporta una evidencia directa con una alta sensibilidad durante las primeras etapas de la infección cuando en otros métodos, particularmente la serología, aún no se elevan los títulos de anticuerpos (Paddock, 2013). La IHQ de biopsia cutánea en especímenes es 100% específico y 70% sensible en el diagnóstico de fiebre manchada, aunque la sensibilidad es mayor en las escaras, ya que se encuentra mayor concentración de organismos en comparación con lesiones de erupción cutánea (Biggs, 2016).

### **Métodos de Laboratorio para el Diagnóstico de Rickettsiosis**

El diagnóstico de Rickettsiosis también incluye otras metodologías inmunológicas, así como la asociación entre características clínicas y pruebas de laboratorio, herramientas útiles para identificar una Rickettsiosis por grupo de fiebre manchada o fiebres tíficas.

## **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se realizan en suero de pacientes durante la fase aguda, tomado durante la primera semana de inicio sintomático (7-10 días) y el de la etapa de convalecencia, en la tercera semana (21-23 días); dichas muestras son pareadas y son el estándar de referencia para la confirmación serológica de la infección rickettsial. La prueba de IFI consiste en antígenos rickettsiales fijados en una laminilla, los cuales son

detectados por anticuerpos (Ac's) específicos en el suero del paciente, que entonces puede ser identificado por un conjugado marcado con fluoresceína, confirmando el diagnóstico si la segunda muestra cuadruplica los títulos de la primera. Existen algunos kits comerciales de Ac's de inmunoglobulina G (IgG) reactivos, por ejemplo, para *Rickettsia* identifica dos grupos, el de fiebre manchada y el de fiebres tíficas (La Scola, 1997; Biggs, 2016).

### **Weil-Felix**

La prueba de Weil-Félix se basa en la detección de Ac's contra diversas especies de *Proteus* que contienen antígenos con epítopes de reacción cruzada con antígenos de miembros del género *Rickettsia*, con excepción de *R. akari*. El antígeno somático de *Proteus vulgaris* OX-2 reacciona con sueros de personas infectadas con *Rickettsia*, con la excepción de aquellos con fiebre manchada, mientras los de *P. vulgaris* OX-19 reaccionan con suero de personas infectadas con *Rickettsia*, tanto del grupo de fiebres manchadas como el de tíficas (La Scola, 1997).

### **Inmunocromatografía**

En la prueba rápida de inmunocromatografía, los anticuerpos IgM antihumana e IgG humana se inmovilizan en la membrana de nitrocelulosa como dos líneas de ensayos individuales (línea IgM y línea IgG) en la ventana de ensayo del dispositivo. Cuando la muestra de suero o plasma fluye a través de la membrana, si están presentes los anticuerpos específicos (IgM o IgG) de *Rickettsia*, se unen formando un complejo que se identifica con el conjugado antígeno coloidal recombinante específico de *Rickettsia* con colorante de Rickigenia, si están presentes en la muestra. Este complejo se mueve más lejos y queda inmovilizado por las proteínas de unión de IgG antihumana y/o IgG humana recubiertas en la membrana produciendo una banda visible, la

ausencia de color indica un resultado negativo. (Quick view <sup>TM</sup>, Lumiquick, La Scola, 1997).

### **Sistema de Puntuación**

Una alternativa menos específica son los sistemas de puntuación basados en hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes con sospecha de fiebre manchada, que se compara con pacientes sin el padecimiento. Tiene una puntuación total de 35 (25 puntos, características clínicas y 10 puntos, pruebas de laboratorio). La mediana de puntuación en los pacientes con fiebre manchada es de 22 (Rango, 10-30). Obteniendo una sensibilidad y especificidad mayor del 90% (Rathi, 2011).

El criterio diagnóstico por puntuación en Fiebre manchada mediterránea por *Rickettsia canorii*, contiene criterios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio, en el cual un resultado positivo debe ser  $\geq 25$  (Brouqui, 2004).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Generalidades**

Se trató de un estudio transversal para estimar la confiabilidad de la prueba PCR para detectar *Rickettsia rickettsii* en muestras sanguíneas de pacientes con sospecha clínica de fiebre manchada que recibieron atención en hospitales públicos de Hermosillo, Sonora entre el 1º de enero de 2015 y el 1 de diciembre del 2017. Para validar la técnica de PCR se usó como referencia a la determinación de qPCR del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) previa aprobación institucional de la Secretaría de Salud Pública del Estado de Sonora, así como dictamen favorable por un comité de ética en investigación.

#### **a) Sitio y Sujetos de Estudio**

El proyecto se enfocó en pacientes de hospitales, clínicas y centros de salud del estado de Sonora, institucionales y de iniciativa privada; las muestras procedieron de hospitales que funcionan como centros de referencia para la atención de pacientes con diagnóstico presuntivo de FMRR en toda la entidad.

#### **b) Tipo y Tamaño de Muestra**

Se empleó un muestreo no probabilístico de una serie consecutiva de pacientes con sospecha clínica de fiebre manchada no especificada (CIE-10 A77.9) que recibieron el diagnóstico en unidades de salud del estado de Sonora. Considerando los antecedentes del último lustro, se estimó un grupo de 90 sujetos con sospecha de fiebre manchada y se consideró aproximadamente 30 pacientes como control negativo, con síndrome febril, sin sospecha clínica de fiebre manchada.

### **c) Procedimientos de Recolección de Datos**

La información clínica de los sujetos elegidos se obtuvo a través del cuestionario “Estudio Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores” (Figura 1) empleado regularmente en el Sistema Nacional de Salud para el registro epidemiológico de casos de la enfermedad.

### **d) Procedimientos de Recolección de las Muestras Biológicas**

Para ser elegibles, los pacientes debieron recibir un diagnóstico presuntivo de fiebre manchada (CIE-10 A77.9) establecido por la valoración cegada del personal de salud de la unidad médica de atención. Para propósitos de la evaluación de la prueba de PCR, en la primera etapa (6 meses) del estudio a los pacientes con este diagnóstico se les tomó una muestra sangre total (3-6 cc), utilizando EDTA o citrato de sodio como anticoagulante (Lineamientos InDRE, 2017) y/o de suero en tubo sin anticoagulante. En la segunda etapa del estudio únicamente se obtuvo sangre total y muestras serológicas fueron procesadas sólo en casos extraordinarios, cuando no fue posible obtener muestra de sangre total, sea por defunción o porque la muestra procedía de hospitales ubicados fuera de Hermosillo.

Todas las muestras se recolectaron preferentemente antes del inicio de tratamiento con antimicrobianos, en contenedores estériles y tapa hermética (La Scola, 1997; Oteo, 2014). Cada muestra se identificó con el nombre del paciente, cuidando una adecuada red fría durante su transporte hacia el Laboratorio de Bioquímica Clínica y Biología Molecular del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora [LBCBM] (Brouqui, 2004). La muestra fue procesada en un término no mayor a 24 horas una vez recibida en el laboratorio.

**SISTEMA NACIONAL DE SALUD**  
**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE CASO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR**

<b>I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE</b>			
No. de afiliación o expediente: _____		Folio de Caso: _____	
Nombre: _____		RFC: _____ CURP: _____	
Apellido paterno      Apellido materno      Nombre(s)			
<b>DATOS DEL NACIMIENTO</b>			
Fecha de nacimiento: _____		Estado de nacimiento: _____	
Municipio de nacimiento: _____		Jurisdicción de nacimiento: _____	
Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>		Edad: Años <input type="text"/> Meses <input type="text"/> Días <input type="text"/>	
<b>RESIDENCIA ACTUAL</b>			
Domicilio: _____			
Localidad: _____		Municipio: _____	
Estado: _____		Teléfono (s): _____	
Entre: Calle: _____		y calle: _____ C.P. _____	
<b>LUGAR LABORAL</b>			
Domicilio: _____			
Localidad: _____		Municipio: _____	
Estado: _____		Teléfono (s): _____	
Sillo donde pasa mayor parte del tiempo: Trabajo <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Escuela <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> Especifique: _____			
¿Habla lengua indígena? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconoce <input type="checkbox"/> ¿Cuál? _____ ¿Es indígena? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Ignorado: <input type="checkbox"/>			
<b>II. DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE</b>			
CLAVE DE LA UNIDAD: _____		Estado: _____	
Municipio: _____		Jurisdicción: _____	
Delegación: _____		Localidad: _____	
Institución: _____			
FECHA DE SOLICITUD DE ATENCIÓN: _____		FECHA DE NOTIFICACIÓN AL ESTADO: _____	
FECHA DE INICIO DE ESTUDIO: _____		FECHA DE TERMINACIÓN DEL ESTUDIO: _____	
FECHA DE NOTIFICACIÓN A LA DGE: _____		FECHA DE PRIMER CONTACTO CON LOS SERVICIOS DE SALUD COMO CASO PROBABLE DE DENGUE HEMORRÁGICO: _____	
DIAGNÓSTICO PROBABLE: _____		DIAGNÓSTICO FINAL: _____	
<b>III. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS</b>			
PROCEDENCIA: De la Jurisdicción: <input type="checkbox"/> De otra jurisdicción dentro del Estado: <input type="checkbox"/> De otro Estado (Foráneo): <input type="checkbox"/>			
HA VISITADO OTROS LUGARES: EN LAS ÚLTIMAS DOS SEMANAS: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> EN EL ÚLTIMO MES: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			
LUGARES VISITADOS:			
País: _____		Estado/Provincia: _____	
País: _____		Estado/Provincia: _____	
País: _____		Estado/Provincia: _____	
Ciudad/Municipio: _____		Ciudad/Municipio: _____	
Ciudad/Municipio: _____		Ciudad/Municipio: _____	
CONTACTO CON ANIMALES: MOSCO <input type="checkbox"/> CHINCHE <input type="checkbox"/> GARRAPATA <input type="checkbox"/> OTRO <input type="checkbox"/>			
EXISTEN ENFERMOS SIMILARES EN LA LOCALIDAD: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> HA RECIBIDO TRANSFUSIONES SANGÜINEAS: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			
ANTECEDENTES DE MUERTES INUSUALES DE ANIMALES: EQUINO <input type="checkbox"/> AVE <input type="checkbox"/> OTRO <input type="checkbox"/>			
<b>IV. CUADRO CLÍNICO</b> (Si = 1, No = 2, Ignorados = 9)			
Fecha de inicio de signos y síntomas: _____			
Fiebre <input type="checkbox"/>		Temperatura _____ °C	
Fecha de inicio de la fiebre: _____		Fecha de inicio de signos y síntomas: _____	
Cefalea <input type="checkbox"/>	Escalofríos <input type="checkbox"/>	Alteraciones del gusto <input type="checkbox"/>	Estupor <input type="checkbox"/>
Malgias <input type="checkbox"/>	Fotofobia <input type="checkbox"/>	Adenomegalia <input type="checkbox"/>	Desorientación <input type="checkbox"/>
Artralgias leves o moderadas <input type="checkbox"/>	Dolor abdominal intenso <input type="checkbox"/>	Induración <input type="checkbox"/>	Tembor <input type="checkbox"/>
Poliartralgias severas* <input type="checkbox"/>	Diarrea <input type="checkbox"/>	Inflamación de párpado <input type="checkbox"/>	Convulsiones <input type="checkbox"/>
Artritis <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis <input type="checkbox"/>	Disnea <input type="checkbox"/>	Debilidad muscular <input type="checkbox"/>
Dolor de espalda <input type="checkbox"/>	Congestión nasal <input type="checkbox"/>	Alteraciones cardíacas <input type="checkbox"/>	Parálisis <input type="checkbox"/>
Dolor retroocular <input type="checkbox"/>	Tos <input type="checkbox"/>	Nódulos <input type="checkbox"/>	Otitis <input type="checkbox"/>
Exantema <input type="checkbox"/>	Faringitis <input type="checkbox"/>	Úlceras <input type="checkbox"/>	Otros _____
Prurito <input type="checkbox"/>	Rinitis <input type="checkbox"/>	Lesión de membranas mucosas <input type="checkbox"/>	
Vómito persistente <input type="checkbox"/>	Hepatomegalia <input type="checkbox"/>	Ictericia <input type="checkbox"/>	
Náuseas <input type="checkbox"/>	Esplenomegalia <input type="checkbox"/>	Rigidez de cuello <input type="checkbox"/>	
* Incapacitantes			
ESCAPE DE LÍQUIDOS <input type="checkbox"/>		HEMORRÁGIAS <input type="checkbox"/>	
Fecha de inicio de signos y síntomas: _____		Fecha de inicio de signos y síntomas: _____	
Petequias <input type="checkbox"/>	Ascitis <input type="checkbox"/>	Gingivorragia <input type="checkbox"/>	Otros: _____
Equimosis <input type="checkbox"/>	Derrame pleural <input type="checkbox"/>	Epistaxis <input type="checkbox"/>	
Hematomas <input type="checkbox"/>	Edema <input type="checkbox"/>	Hematemesis <input type="checkbox"/>	
Torniquete positivo <input type="checkbox"/>	Red moteada <input type="checkbox"/>	Melena <input type="checkbox"/>	
Otros: _____			
FUE HOSPITALIZADO: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		FECHA(S): INGRESO _____ MANEJO AMBULATORIO: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
NOMBRE DE LA UNIDAD TRATANTE: _____		CLUES: _____	
Clave de la Unidad: _____		Servicio de atención: _____	
Institución: _____		Urgencias médicas <input type="checkbox"/> Terapia intensiva <input type="checkbox"/>	
¿Acudió a unidad de primer nivel? SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Medicina Interna <input type="checkbox"/> Gineco Obstetricia <input type="checkbox"/>	
Número de veces que acudió: _____		Pediatría <input type="checkbox"/> Otras, especifique: _____	
Terapia intermedia <input type="checkbox"/>			
Diagnóstico inicial hospitalario: Fiebre por Dengue: <input type="checkbox"/>		Fiebre Hemorrágica por Dengue: <input type="checkbox"/>	
Estado del paciente: Grave <input type="checkbox"/> No grave <input type="checkbox"/>			
Otro _____			
<b>COMORBILIDAD</b>			
Embarazo: <input type="checkbox"/>		Trastornos hemorrágicos: <input type="checkbox"/>	
Inmunosupresión: <input type="checkbox"/>		Diabetes: <input type="checkbox"/>	
		Hipertensión: <input type="checkbox"/>	
		Erf. ulcero péptica: <input type="checkbox"/>	
		Erf. Renal <input type="checkbox"/>	
		Especifique: _____	

**Figura 1.** Estudio epidemiológico de enfermedades transmitidas por vectores.

<b>V. EVOLUCIÓN EN EL HOSPITAL</b>								
ESTABLE <input type="checkbox"/> GRAVE <input type="checkbox"/> MEJORA <input type="checkbox"/>								
<b>SEGUIMIENTO HEMATOLOGICO</b>								
En caso de haber datos de escape de líquidos o hemorragias, realizar*:								
Fecha:	Hto:	%	Hb:	gr x 100ml.	Plaquetas:	x10 <sup>3</sup>	Albúmina	g/dl
Fecha:	Hto:	%	Hb:	gr x 100ml.	Plaquetas:	x10 <sup>3</sup>	Albúmina	g/dl
Fecha:	Hto:	%	Hb:	gr x 100ml.	Plaquetas:	x10 <sup>3</sup>	Albúmina	g/dl
Fecha:	Hto:	%	Hb:	gr x 100ml.	Plaquetas:	x10 <sup>3</sup>	Albúmina	g/dl
*Repetirlas de acuerdo a la evolución del enfermo								
<b>ESTUDIOS DE GABINETE</b>								
Fecha de ultrasonido: <input type="text"/>			Fecha de radiografía: <input type="text"/>					
Líquido perivisceral y / o en cavidad abdominal <input type="text"/>			Líquido en cavidad torácica <input type="text"/>					
<b>DATOS DE EGRESO</b>								
Fecha de egreso: <input type="text"/>			Alta por Mejoría: <input type="checkbox"/>					
Referido a: <input type="text"/> <small>Unidad Médica</small> <input type="text"/> <small>Institución</small> Número de veces referido: <input type="text"/>								
Alta voluntaria: <input type="checkbox"/> Defunción: <input type="checkbox"/> Fecha de defunción: <input type="text"/>								
<b>VI. ESTUDIO DE LABORATORIO:</b>								
Se tomó muestra para laboratorio: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Folio de Laboratorio <input type="text"/>								
<b>Dengue:</b>		NS1	ELISA IgM	ELISA IgG	PCR-Tiempo Real	Otra ( )		
Fecha toma		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
Fecha de recepción		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
Fecha resultado		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
Resultado		+ <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>	+ <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>	+ <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	+ <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Chikungunya</b>		ELISA IgM	PCR-Tiempo Real					
Fecha toma		<input type="text"/>	<input type="text"/>					
Fecha resultado		<input type="text"/>	<input type="text"/>					
Resultado		+ <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>	+ <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>					
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Paludismo:</b>		Gota Gruesa:	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
Especie:		Paludismo por:	Vivax <input type="checkbox"/>	Falciparum <input type="checkbox"/>				
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Leishmaniasis:</b>		Impronta:	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
		Serología:	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Tripanosomiasis:</b>		Dx parasitológico	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
		Serología:	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Rickettsiosis:</b>		Serología:	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
Titulación:								
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Virus del O. Nilo</b>		Plasma o Suero <input type="checkbox"/>	Fechas: 1a Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
		Suero <input type="checkbox"/>	Fechas: 2da Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
		LCR <input type="checkbox"/>	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
		Biopsia <input type="checkbox"/>	Fechas: Toma	<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
Muestra rechazada: <input type="checkbox"/>		Causa: Lipémica: <input type="checkbox"/> Hemolizada: <input type="checkbox"/> Muestra Insuficiente: <input type="checkbox"/> Días de tránsito: <input type="checkbox"/>						
<b>Otro padecimiento:</b>		Fechas: Toma		<input type="text"/>	Resultado	<input type="text"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/>		
(especificar)								
Laboratorio donde se procesó la muestra: <input type="text"/>								
<b>VII. ESTUDIO DE CASOS COMPATIBLES</b>								
NOMBRE		DOMICILIO		EDAD	SEXO	CASO		
<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	<input type="text"/>		
<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	<input type="text"/>		
<input type="text"/>		<input type="text"/>		<input type="text"/>	M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	<input type="text"/>		
<b>VIII. OBSERVACIONES</b>								
<input type="text"/>								
<input type="text"/>								
NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN LLENÓ EL FORMATO			NOMBRE Y FIRMA DE QUIEN AUTORIZÓ					

Nota: Las fechas se pondrán en el siguiente orden *dia/mes/año*

**Figura 1.** Estudio epidemiológico de enfermedades transmitidas por vectores.  
(Continuación)



Por otro lado, la extracción del ADN se llevó a cabo con el kit comercial QIAamp® DNA Mini. En cada procedimiento de PCR se incluyó un control positivo (ADN de *Rickettsia rickettsii*), uno negativo (mezcla de reacción con ADN distinto de *Rickettsia*) y un blanco de PCR (mezcla de reacción sin ADN) con el fin de garantizar que el procedimiento se llevó adecuadamente, así como para detectar la posible presencia de amplificaciones inespecíficas o contaminación con ADN. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (peso /volumen) en buffer TBE 1X (Tris 50 mM, ácido bórico 40 mM, EDTA 0.5 M), con GelStar® (Lonza), a 90 Volts por aproximadamente 40 minutos. Se utilizó el marcador 100 pares de bases (pb) Ladder (Promega, U.S.A.). Una vez concluida la electroforesis, los geles se observaron en un fotodocumentador WGD-305, (WiseDoc, Korea) y se capturaron con el programa Wise Capture II-1000. El análisis de los geles se llevó a cabo utilizando el programa TotalLab (U.S.A.).

#### **e) Procedimientos Técnicos**

Existen diferencias en los procedimientos técnicos de los tres laboratorios que describimos y comparamos, por lo que se detalla la preparación de la mezcla de reacción, iniciadores y PCR, mismas que requieren condiciones distintas de ciclos, tiempo y temperatura. También existen diferencias en el proceso post-PCR, específicamente en la electroforesis para la PCR convencional y en la lectura de los resultados de qPCR, por esto se describe el procedimiento a continuación:

#### **PCR-LBCBM de la Universidad de Sonora**

**Extracción de ADN:** Una vez recibida la muestra en el laboratorio se colocaron en un microtubo estéril de 1.5 ml, 200 µL de la muestra de sangre total durante la primera etapa del proyecto y durante la segunda etapa 200 µL

del paquete globular (separado por centrifugación), en el caso de muestras de suero se centrifugaron y se tomó 200 µL del precipitado, posterior a la adición de muestra se agregó 100 µL de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS), 20 µL de proteinasa K y 200 µL de solución AL, utilizando para la extracción el QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN.

En caso de contar solamente con 100 µL de muestra, se agrega la mitad de los reactivos de PBS, proteinasa K y solución AL, para que sea proporcional a la cantidad inicial de la muestra y se continua el procedimiento como se indica el fabricante, se resguardó el ADN extraído de las muestras a -20°C.

**Identificación Género *Rickettsia* gen *gltA*:** La PCR convencional para diagnosticar el género *Rickettsia* identificando el gen *gltA* se realizó en el termociclador Bio-Rad ICycler preparando una reacción por cada muestra con 25 µL de mezcla de reacción, usando los iniciadores CS-1(F) y CS-2(R) (0.8 µM), diseñados para amplificar un fragmento de 401 pares de bases del gen citrato sintasa (*gltA*), agregando MgCl<sub>2</sub> (3 mM), oligonucleotidos (200 µM), buffer 5X, Taq ADN polimerasa (0.5 U) y 5 µL de ADN previamente purificado de la muestra, control positivo (ADN de *Rickettsia rickettsii*), control negativo (ADN de un paciente con enfermedad febril, no FMMR) y agua destilada estéril para el blanco de PCR.

En casos especiales como: muestras de suero, muestras de pacientes que iniciaron con tratamiento de doxiciclina, pacientes graves o defunciones, se agregaron 8 µL del ADN en la mezcla de reacción para poder amplificar el gen de interés en caso de estar presentes en la muestra en una baja concentración.

Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a: 95°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente un ciclo a 72°C por 10 minutos,

conservando los productos a 4°C hasta apagar el equipo y posteriormente en congelación (Labruna, 2004).

Para realizar la electroforesis se agregaron 10 µL del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%, con una dilución 1:10 del reactivo GelStar® (Lonza), con marcador de peso molecular de 100 pares de bases DNA Ladder (Promega), después de 60 minutos a 90 volts en la cámara de electroforesis Bio-Rad, los geles se observaron en un fotodocumentador WGD-305, (WiseDoc, Korea) y se capturaron con el programa Wise Capture II-1000. El análisis de los geles se llevó a cabo utilizando el programa TotalLab (U.S.A.).

**Identificación de especie *rickettsii*, proteína hipotética A1G 04230:** Para realizar la PCR convencional de la proteína hipotética A1G\_04230, que es el gen específico para especie, precalentar los iniciadores a 95°C por 5 minutos para evitar la formación de dímeros, los cuales se identificaron durante la primera etapa del presente trabajo, considerando la descripción del procedimiento para la identificación del gen *gltA*, en la preparación de la mezcla de reacción sólo cambiaríamos los iniciadores, que en este caso son: RRi1(F) y RRi2(R) (0.8 µM).

Las condiciones de los ciclos de PCR en el termociclador Bio-Rad C1000 fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a: 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente un ciclo a 72°C por 10 minutos, conservando los productos a 4°C hasta apagar el equipo y posteriormente en congelación. El procedimiento de electroforesis se realizó a la par en ambas amplificaciones (género y especie), se observó para la confirmación de especie una banda de 153 pares de bases (Modificado de: Kato, 2013).

### **qPCR- CDC para *Rickettsia rickettsii***

**Identificación de género con PanR8 y de especie con RRI6:** Se utilizó para la extracción el QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN, siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante, para la mezcla de reacción se consideró un volumen final de 25 µl, se añadieron 20 µl de la mezcla para permitir la adición de 5 µl de ADN, (incluidos un control positivo y 3 controles negativos [NTC]). Para la mezcla de reacción de PanR8: Quanta qScript XLT (Master Mix), iniciadores PanR8-F y PanR8-R, sonda PanR8-P y agua deionizada estéril. Para la mezcla de reacción de RRI6: Quanta qScript XLT (Master Mix), iniciadores RRI6-F y RRI6-R, sonda RRI6-P y agua deionizada estéril.

Se utilizó una placa de 96 pozos o tiras con máximo 8 pozos para agregar las mezclas de reacción de género y especie para colocarla a la par en el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast, y con el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C por 8 minutos, 45 ciclos a: 95°C por 05 segundos y 60°C por 30 segundos. Las sondas TaqMan en las técnicas de qPCR tienen un fluoróforo específico en un extremo y un apagador en el pto extremo, que al amplificar el ADN se hidroliza produciendo una fluorescencia que es identificada por el termociclador, se interpretó como positivo una curva de amplificación en la línea de corte menor a los 40 ciclos y la ausencia de la gráfica sigmoidea como negativo.

### **qPCR por InDRE del género *Rickettsia***

**Identificación de género por el gen *gltA*:** Para la identificación del gen *gltA*, se consideró la cantidad de 400 µl de muestra tomando el paquete globular y siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante para la extracción del ADN con QIAamp DNA Blood Mini Kit y para la preparación de la mezcla de reacción

la cantidad de 20  $\mu$ l a cada tubo o pozo, se adicionó 5  $\mu$ L de ADN de la muestra y de controles.

Mezcla de reacción para gen *gltA*: Enzima Gene Expression, iniciadores CS-F y CS-R (10 pmol/ $\mu$ M), sonda CS-P (10 pmol/ $\mu$ M), MgCl<sub>2</sub> 25 mM y agua deionizada estéril. Mezcla para PCR para gen *RNAsa P*: Enzima Gene Expression, iniciadores RNaseP-F y RNaseP-R (10 pmol/ $\mu$ M), sonda RNaseP-P (10 pmol/ $\mu$ M), MgCl<sub>2</sub> 25 mM y agua deionizada estéril.

Después de preparar las dos mezclas de reacción, se procedió a la amplificación en el termociclador 7500 fast con el siguiente programa: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 45 ciclos a: 95°C por 20 segundos y 60°C por 40 segundos.

La presencia de una curva sigmoidea bien definida al igual que la qPCR de CDC nos indica un resultado positivo, tomando como punto de corte menos de 38 ciclos, la qPCR de RNAsaP se realiza al mismo tiempo como control de ADN humano para asegurar la integridad de la muestra.

Los iniciadores y sondas específicas para cada uno de los procedimientos descritos por PCR y qPCR de los tres laboratorios, que comparamos para calcular la confiabilidad por el coeficiente de kappa, se describen en la tabla I.

#### **f) Plan de Análisis**

Para estimar la confiabilidad de PCR se compararon los resultados de la prueba con los obtenidos por qPCR en el InDRE y el LESP, para la identificación de género. En el caso de especie se comparó con qPCR en el Laboratorio del Departamento de Enfermedades Rickettsiales del CDC. Un resultado de PCR convencional fue considerado positivo cuando se observó la presencia de una banda con un número de pares de bases acorde con el tamaño esperado para

**Tabla I.** Objetivos de amplificación de las técnicas comparadas para evaluar la confiabilidad de PCR convencional para el diagnóstico de *Rickettsia rickettsii*, con las secuencias de iniciadores y sondas.

<b>LBCBM – PCR*</b>	
<b>Objetivos</b>	<b>Secuencias de iniciadores y sondas (5' - 3')</b>
<i>Rickettsia</i> spp.	CS-F GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT CS-R GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T
<i>R. rickettsii</i>	RRi6-F AAA TCA ACG GAA GAG CAA AAC RRi6-R CCC TCC ACT ACC TGC ATC AT
<b>CDC – qPCR+</b>	
<i>Rickettsia</i> spp.	PanR8_F AGC TTG CTT TTG GAT CAT TTG G PanR8_R TTC CTT GCC TTT TCA TAC ATC TAG T PanR8_P FI-CCT GCT TCT ATT TGT CTT GCA GTA ACA CGC CA-BHQ1
<i>R. rickettsii</i>	RRi6_F AAA TCA ACG GAA GAG CAA AAC RRi6_R CCC TCC ACT ACC TGC ATC AT RRi6_P FI-TCC TCT CCA ATC AGC GAT TC-BHQ1
<b>InDRE – qPCR^</b>	
<i>Rickettsia</i> spp.	CS-F TCG CAA ATG TTC ACG G TACTT T CS-R TCG TGC ATT TCT TTC CAT TGTG CS-P 6-FAM-TGC AAT AGC AAGAAC CGT AGG CTG GATG BHQ-1
ADN Humano	RNaseP-F CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG-3) RNaseP-R TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG RNaseP-P FAM-CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC BHQ-1

**LBCBM – PCR\***= Laboratorio de Bioquímica Clínica y Biología Molecular del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora- PCR convencional de género y especie del presente estudio (Labruna, 2004; Modificado de Kato, 2013)

**CDC – qPCR+**= Centros de diagnóstico y control de enfermedades de Estados Unidos-PCR en tiempo real de género y especie (Kato, 2013).

**InDRE – qPCR^**= Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica-PCR en tiempo real para género y ADN humano como control de la muestra (Lineamientos InDRE, 2017).

cada uno de las secuencias amplificadas: gltA (Labruna, 2004) y A1G\_04230 (Kato, 2013). Y en el caso de qPCR se observó la sigmoide en el gráfico del programa, cuantificable respecto al ciclo de amplificación. La confiabilidad de la prueba PCR fue examinada mediante el coeficiente de Kappa (K). Se calculó el intervalo de confianza al 95% para cada uno de los estimadores obtenidos. Las diferencias proporcionales entre las distintas muestras biológicas fueron examinadas mediante una prueba de Chi-cuadrada para igualdad de proporciones.

#### **g) Consideraciones Éticas**

Este proyecto tiene un beneficio identificado que puede ser utilizado para mejorar las condiciones de salud de esta población. No simplifica ni duplica investigación previa realizada en la región. Envuelve un tamaño de muestra estadísticamente apropiado y los resultados del estudio serán divulgados mediante reportes técnicos, presentaciones y artículos de investigación científica.

El consentimiento informado y signado por los padres o responsables legales del menor fue obligatorio para que el sujeto se incluyera en la investigación. Dicho consentimiento era rutinariamente aplicado por el personal médico de los hospitales participantes a todo paciente que es hospitalizado. La decisión de participar en el estudio fue especialmente considerada en los niños menores de 7 años, a los que se les respetó su decisión de no participar aun cuando se contara con la aprobación de sus padres o tutores. Si las condiciones clínicas (p.e. la severidad del cuadro) fueron un impedimento para conseguir el asentimiento del menor, su tutor responsable debió tomar la decisión, buscando el beneficio del sujeto elegido.

La participación en este estudio no implicó ningún costo económico para los menores elegidos ni sus familiares, y se buscaron las estrategias para garantizar un adecuado manejo clínico y epidemiológico de los sujetos con una prueba positiva, incluyendo los estudios de laboratorio y el tratamiento específico subsecuente a la positividad de la PCR, qPCR o de la IFI.



## RESULTADOS

### Primera Etapa o de Estandarización

Durante esta etapa del estudio, en el LBCBM, mediante PCR convencional se identificó el gen *gltA* para confirmar género de *Rickettsia*; mientras para identificar la especie *rickettsii*, se utilizó la región blanco A1G\_04230, que codifica para la proteína hipotética, misma que también es identificada en CDC. Posteriormente, se enviaron alícuotas de ADN de las muestras procesadas en el LBCBM de la Universidad de Sonora a los Centros de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, para realizar qPCR e identificar género de *Rickettsia* con la identificación de Panrickettsia (PanR8) y la especie *rickettsii* se centran en el ARNr 23S (un componente de la subunidad 50S y en un gen que codifica la proteína hipotética A1G\_04230 (número de acceso de GenBank ABV76353; cepa Sheila Smith de *R. rickettsii*), respectivamente,

En esta etapa se evaluó la concordancia con el coeficiente de kappa, de las técnicas qPCR y PCR convencional utilizada en los dos laboratorios. Los resultados se despliegan en la tabla II.

#### Coeficiente de kappa

$$\text{Coeficiente kappa} = \frac{(\% \text{ de concordancia observada}) - (\% \text{ de concordancia esperada debida al azar})}{100 - (\% \text{ de concordancia esperada debida al azar})}$$

% Concordancia observada= [(34+124) /172] (100) = 91.9%

Concordancia debida al azar=

(42/172) (100) = 24.4%

(40/172) (100) = 23.3%

(42) (0.24) = 10.1

(132/172) (100) = 76.7%

(130/172) (100) = 75.6%

(130) (0.76) = 98.8

% Concordancia debida al azar= [(10.08+98.8) /172] (100) = 63.3%

$$\text{Coeficiente de Kappa} = \frac{91.9 - 63.3}{100 - 63.3} = \frac{28.6}{36.7} = 0.78$$

IC 95% Coeficiente de Kappa = 0.78 [IC del 95%= (0.664-0.888)]

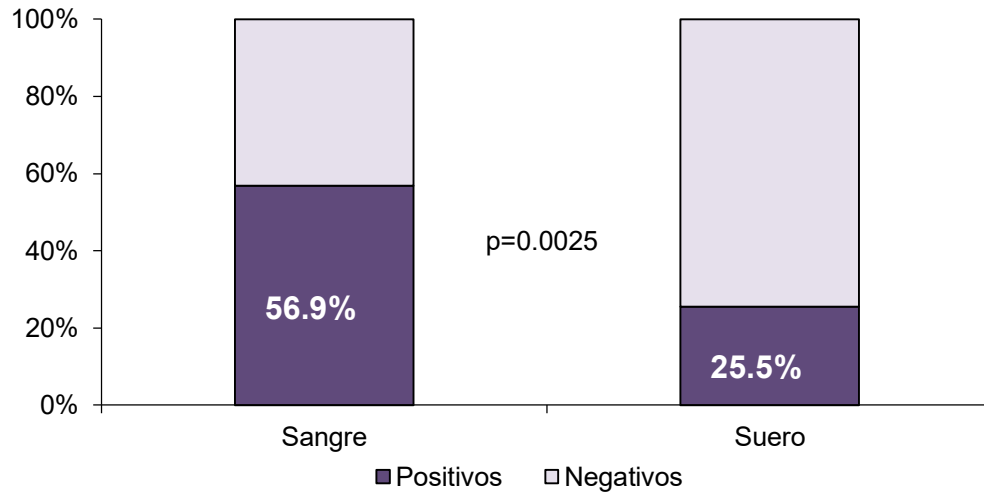
**Tabla II.** Resultados en muestras sanguíneas para *R. rickettsii* en los laboratorios de prueba

qPCR+	PCR convencional*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	34	8	42
Negativo	6	124	130
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>132</b>	<b>172</b>

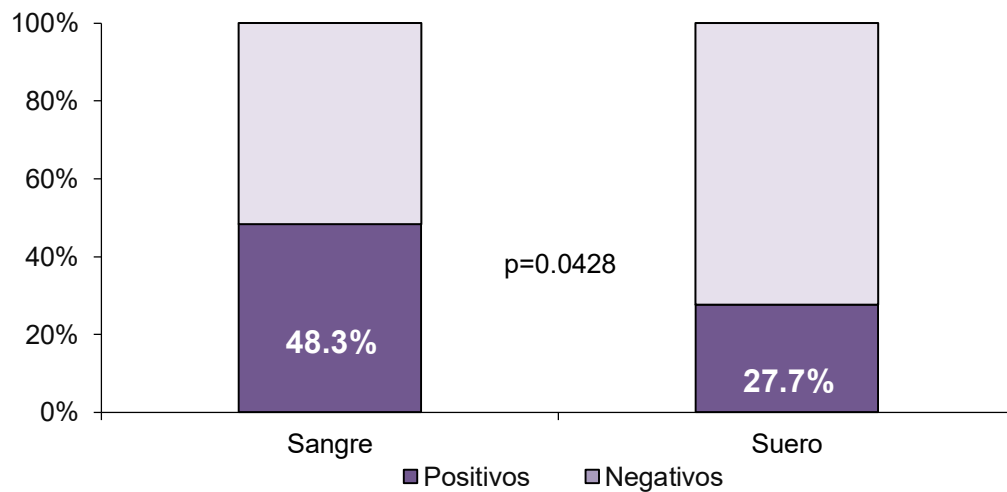
PCR convencional\*= LCBM                      qPCR+= Laboratorio de CDC

Por otro lado, cuando se comparó el resultado de 51 muestras pareadas de sangre total y suero, procesadas por PCR para *R. rickettsii*, se apreció que hubo una mayor proporción (56.9%) de positivos en las muestras sanguíneas que en las de suero (25.5%), esa diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0.0025$ ) Figura 2.

Cuando se examinaron los resultados de 107 muestras procesadas por PCR convencional, 60 (56.1%) de sangre total y 47 (43.9%) de suero, de pacientes pediátricos que recibieron el diagnóstico clínico de FMRR en el HIES, se observó una mayor proporción (48.3%) de las muestras sanguíneas fueron positivas y que en las muestras serológicas (27.7%). Esta diferencia fue significativa ( $p=0.0484$ ) Figura 3.



**Figura 2.** Distribución proporcional de resultados positivos y negativos de PCR para *R. rickettsii* en muestras de sangre total y suero (n= 51), con una p<0.05.



**Figura 3.** Distribución proporcional de resultados positivos y negativos de PCR para *R. rickettsii* en muestras de sangre total (n=60) y suero (n=47) de pacientes pediátricos, con una p<0.05.

## Segunda Etapa

Esta etapa comprendió el seguimiento del proyecto, entre 2016 y 2017; y básicamente consistió en la comparación de muestras procesadas en LBCBM y en el InDRE. La contrastación se realizó únicamente para el género *Rickettsia*, identificando el gen *gltA*, pues el InDRE no identificaba la especie *rickettsii*. Por tal motivo, se evaluó la concordancia con coeficiente de kappa, entre las técnicas qPCR (InDRE) y PCR convencional (LBCBM).

En total, fue comparado el resultado de 443 muestras tal como se detalla en la tabla III.

### Coeficiente de kappa

$$\text{Coeficiente kappa} = \frac{(\% \text{ de concordancia observada}) - (\% \text{ de concordancia esperada debida al azar})}{100 - (\% \text{ de concordancia esperada debida al azar})}$$

$$\% \text{ Concordancia observada} = [(124+301) / 443] (100) = 95.94\%$$

Concordancia debida al azar=

$$(132/443) (100) = 29.8$$

$$(134/443) (100) = 30.2$$

$$(132) (0.30) = 36.9$$

$$(311/443) (100) = 70.2$$

$$(309/443) (100) = 69.7$$

$$(311) (0.70) = 217.7$$

$$\% \text{ Concordancia debida al azar} = [(36.9+217.7) / 443] (100) = 57.5\%$$

$$\text{Coeficiente de Kappa} = \frac{95.94 - 57.47}{100 - 57.47} = \frac{38.47}{42.53} = 0.90$$

$$\text{IC 95\% Coeficiente de Kappa} = 0.904 [\text{IC del 95\%} = (0.860-0.947)]$$

**Tabla III.** Resultados en muestras sanguíneas para *Rickettsia* spp. en los laboratorios de prueba.

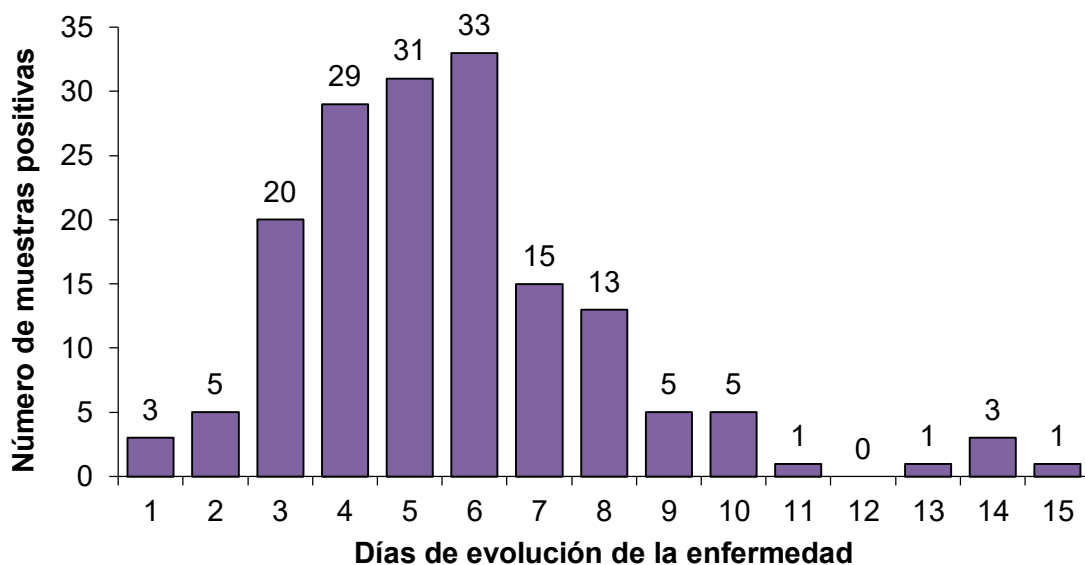
qPCR+	PCR convencional*		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	124	8	132
Negativo	10	301	311
<b>Total</b>	<b>134</b>	<b>309</b>	<b>443</b>

PCR convencional\*= LBCBM      qPCR+= Laboratorio de CDC

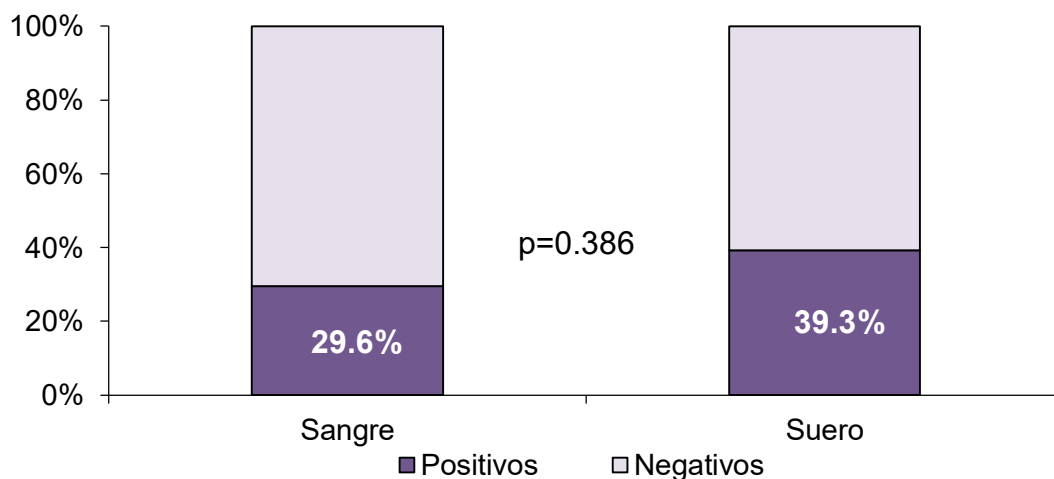
Por otro lado, cuando se examinaron 165 muestras sanguíneas con resultado positivo a *Rickettsia rickettsii*, procesadas por PCR convencional, de acuerdo al periodo transcurrido entre el inicio de síntomas y el día en que se tomó la muestra, cuya media fue de  $5.6 \pm 2.44$  de desviación estándar. Al respecto, se apreció que la mayor proporción (77.6%) se ubicó en el rango entre los 3 y 7 días. No obstante esto, de modo interesante se observó que 29 (18.2%) sujetos resultaron positivos a pesar de que la muestra se tomó entre los días 8<sup>o</sup> hasta el 15<sup>o</sup> de evolución clínica como se observa en la figura 4.

En este segundo periodo, también se comparó la proporción de resultados positivos en muestras sanguíneas y de suero procesadas mediante PCR convencional para *R. rickettsii* en los años 2016 (n=125) y 2017 (n=295). En general, y debido a los criterios establecidos en los hospitales para tomar la muestra biológica cuando se sospecha de FMRR, se procesaron 392 muestras de sangre y únicamente 28 de suero; el porcentaje de positividad fue de 29.6% en las muestras sanguíneas y de 39.3% en el suero. Esta diferencia no fue significativa ( $p=0.386$ ) figura 5.

Al evaluar la distribución proporcional de positivos a *R. rickettsii* en muestras procesadas mediante PCR convencional, de acuerdo al grupo etario (<18 años y adultos) de los sujetos sospechosos de FMRR, se observó una discreta diferencia, pues en los pacientes pediátricos el porcentaje de positivos fue de 34.1% (n=185) mientras en los adultos fue de 27.2% (n=235). Esta diferencia no fue significativa ( $p=0.160$ ) figura 6.

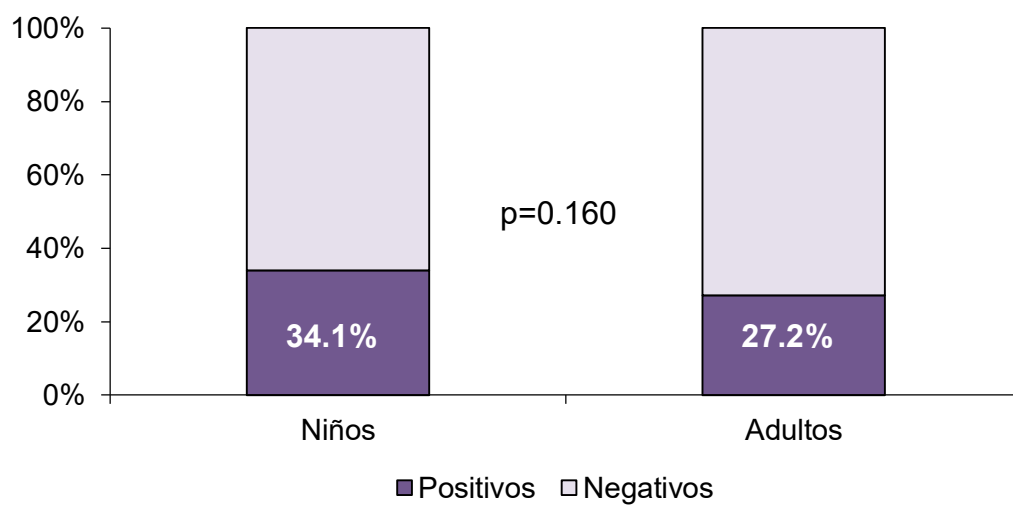


**Figura 4.** Días desde el inicio de síntomas hasta la toma de muestra en pacientes positivos para *R. rickettsii* por PCR convencional (n=165).



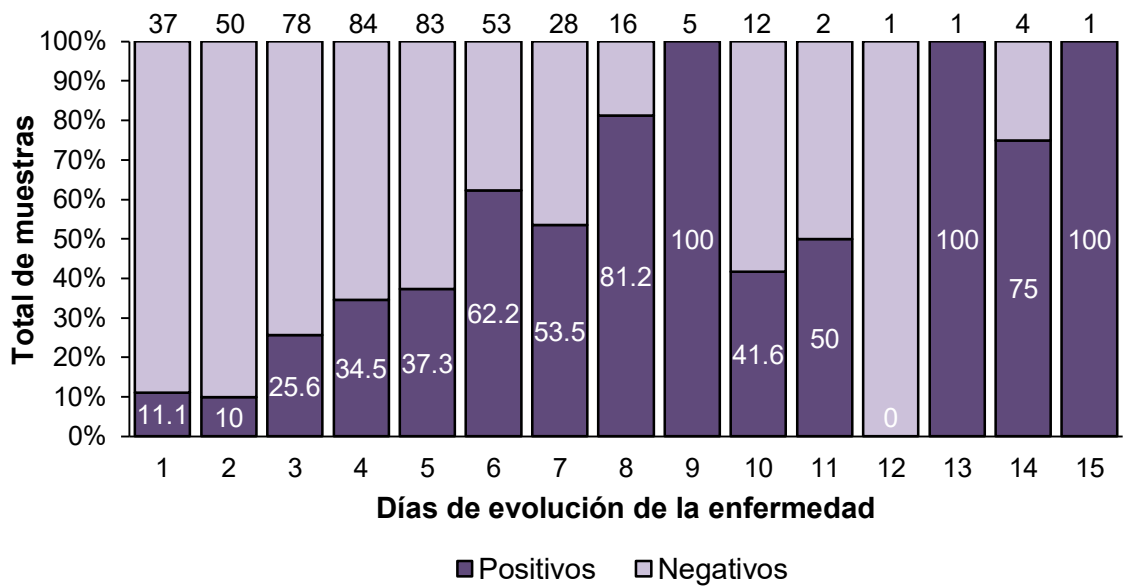
**Figura 5.** Distribución proporcional de resultados positivos y negativos en muestras sanguíneas (n=392) y suero (n=28) para *R. rickettsii* en PCR convencional durante los años 2016-2017.





**Figura 6.** Distribución proporcional de resultados en pacientes pediátricos (n=185) y adultos (n=235) para *R. rickettsii* en PCR convencional en los años 2016-2017.

Finalmente contemplando el total de muestras procesadas en los distintos días de inicio de síntomas, observamos una mayor frecuencia en toma de muestras durante los días 1-7 de evolución clínica, probablemente porque son los días de la etapa aguda con manifestaciones clínicas del proceso infeccioso. Se encontró una mayor proporción de resultados positivos en las muestras tomadas entre el 6° y el 8° día. Un hallazgo importante, es que aunque el número de muestras disminuyó en pacientes (n=26) que se encontraban entre los días 9 y 15 de evolución, aun se pudo confirmar el diagnóstico en 16 de ellos, lo que representó 61.5% de positividad. En la figura 7 se detalla el porcentaje de positividad de acuerdo al día de evolución en el que se tomó la muestra.



**Figura 7.** Días desde el inicio de síntomas hasta la toma de muestra de pacientes positivos y negativos, en proporción con el total de muestras para diagnóstico de *R. rickettsii* por PCR (n= 455).

## DISCUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio señalan que la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional es una técnica confiable para confirmar el diagnóstico de fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii*, en pacientes con sospecha clínica de la enfermedad. Los resultados de PCR convencional fueron comparados con los de PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), encontrando una concordancia sustancial ( $k=0.78$ ), al compararlos con los del Laboratorio de Zoonosis Rickettsiales de CDC y una concordancia ( $k=0.90$ ) casi perfecta respecto a los del InDRE, de acuerdo a la escala propuesta por Landis y Koch (1977), la mayor concordancia con InDRE puede deberse a que identificamos el mismo gen (*gltA*), solo considerando el diagnóstico de género.

Nuestros resultados pueden ser relevantes para el ámbito clínico y de salud pública en regiones similares a las del estudio, que carecen de qPCR, pues en adición a demostrar que PCR convencional es un método confiable para confirmar casos de FMRR, encontramos que es útil incluso en muestras clínicas de sangre y suero que fueron tomadas después del 7° y hasta el 15° día tras el inicio sintomático, lo que no ha sido previamente documentado, ya que la recomendación estándar es realizar PCR en muestras tomadas dentro de los primeros 7 días de la enfermedad (Lineamientos InDRE, 2017; Oteo, 2014; Kato, 2013; Biggs, 2016).

Es importante destacar los resultados positivos obtenidos entre los días 8 y 15 de evolución de la enfermedad, pues aunque se acepta que hay una relación inversa entre la carga bacteriana detectable y el título de las inmunoglobulinas G (Schneeberger, 2009), en este periodo la PCR puede ser una alternativa diagnóstica confiable, incluso en aquellos pacientes con un resultado negativo, en quienes debe realizarse entonces una prueba mediante IFI. Además, recomendaríamos que en los sujetos con más de 7 días de

evolución y un resultado negativo se lleven a cabo dos reacciones de PCR, la primera con 5 µl y la segunda con 8 µl de ADN, ya que la concentración de ADN es crítica para mejorar los resultados del método y de esta forma incrementar la probabilidad de identificar los genes presentes. (Leal, 2013)

Lo anterior puede ser relevante ya que no hay consenso para el uso poblacional de las técnicas moleculares disponibles ni para el manejo clínico de pacientes, particularmente cuando se utilizan en muestras de sangre total tomadas después del 7° día de evolución, en donde puede haber escasa carga bacteriana (Biggs et al, 2016; Kato et al, 2013), algo que es similar respecto a las pruebas serológicas que no representan una herramienta diagnóstica útil para confirmar el diagnóstico de FMRR durante los primeros siete días de la enfermedad.

Por otra parte, es importante señalar que qPCR tiene la ventaja de cuantificar los productos de su amplificación, lo que también permite identificar la concentración bacteriana en relación a las amplificaciones de los productos del género *Rickettsia*, esto es posible mediante el empleo del gen citrato sintasa *gltA* (con 1311 pares de bases de ADN lineal, GenBank U59729), por ser una región del genoma altamente conservada, la que ha mostrado una elevada sensibilidad y especificidad incluso empleando otros iniciadores y sondas, obteniendo diferentes productos de amplificación de distintas regiones del gen (Stenos, 2005, Rox, 1997) como en Brasil (Rogental T, 2006), Panamá (Estripeaut D, 2007), Costa Rica (Argüello AP, 2012) y México (Zavala-Castro, 2008, Labruna, 2004). Esto mismo ocurrió en nuestro estudio, pues al comparar las técnicas de PCR convencional y qPCR identificamos regiones específicas y conservadas del gen *gltA* y no el gen completo, con lo que obtuvimos una concordancia casi perfecta en la identificación del género *Rickettsia*.

Al evaluar la concordancia del gen específico para la especie *rickettsii*, la región que codifica para la proteína hipotética identificada como A1G\_04230 (Kato, 2013), obtuvimos una concordancia sustancial ( $k=0.78$ ) entre PCR convencional y qPCR, que fue probablemente debido a diferencias técnicas en los procedimientos entre ambos métodos diagnósticos, como identificar distinto gen, 45 ciclos de la qPCR y la integridad del ADN que enviamos al CDC. No obstante, considerando la naturaleza exploratoria y de estandarización de nuestro estudio, la concordancia alcanzada puede considerarse de forma positiva, pues no tenemos conocimiento de que estudios previos lo hubieran realizado en muestras clínicas poblacionales, aunque a nivel de laboratorio Kato (2013) validó la especificidad del gen A1G\_04230 para *R. rickettsii* comparándola con cepas de *Rickettsia* de distintas especies (p.e. *R. akari*, *R. massiliae*, *R. conorii*, entre otras), hongos y otras bacterias.

En tal contexto, para conservar la concordancia entre PCR convencional y qPCR, toda vez que el producto de amplificación del gen A1G\_04230 que obtuvimos fue de 153 pares de bases, es necesario que en el procedimiento de PCR convencional se incorpore un precalentamiento de iniciadores por 5 minutos a 95°C, con el propósito de evitar la formación de dímeros o la amplificación de productos inespecíficos, que usualmente ocurre por la afinidad entre los iniciadores F y R (forward y reverse, por sus siglas en inglés), esto lo identificamos e implementamos desde la fase de estandarización. (Linhart, 2005).

En este sentido, es importante que en regiones endémicas como el estado de Sonora, se fortalezca la búsqueda de regiones más específicas de ADN y se mejore el diseño de iniciadores basados en la secuenciación de las cepas regionales de *Rickettsia rickettsii*, lo que puede ser relevante para la salud pública y la atención médica, puesto que se han documentado hasta diez cepas distintas de esta bacteria, que aunque poseen mínimas diferencias en la

secuenciación, se asocian a marcadas diferencias en la expresión clínica de los factores de virulencia (Fournier, 2009; Clark, 2015)

Por otro lado, en nuestro estudio se apreció que en algunos pacientes clínicamente compatibles con FMMR, no fue posible obtener un resultado de PCR positivo en la muestra sanguínea analizada, en PCR convencional y qPCR ya que cuando se les tomó la muestra, tenían más de 24 horas con la administración del antibiótico específico, dado que los pacientes estaban hospitalizados en condiciones de severidad clínica, se les administró doxiciclina intravenosa.

La doxiciclina es una tetraciclina de acción bacteriostática de larga duración, que actúa en los microorganismos gramnegativos, transportada a la célula por difusión pasiva y también mediante un sistema de transporte activo ATP-dependiente. Esto es importante, porque dentro de la célula, la doxiciclina se fija en la subunidad ribosómica 30S bloqueando la unión del aminoacil-RNA de transferencia al RNA mensajero, lo que inhibe la síntesis de proteína disminuyendo la cantidad de bacterias en circulación y también mermando la probabilidad de identificar sus genes con técnicas de PCR (Bassetti, 2011), lo que puede enmascarar el diagnóstico de FMMR, pero sin la capacidad de evitar las lesiones que la infección provocó en diversos órganos y sistemas, lo que hace factible el diagnóstico por IFI en días posteriores, que si bien es clínicamente útil, puede generar discordancias al comparar resultados entre PCR e IFI.

Además de las limitaciones metodológicas que se describieron con el procesamiento de las muestras, otros factores que pueden afectar negativamente la calidad de los hallazgos incluyen el diseño transversal que empleamos, pues impide que podamos establecer relaciones de causalidad, y en el caso específico de la calidad de la muestra, estuvimos sujetos al momento

en que el paciente llegó al hospital, a la sospecha médica, al tratamiento administrado, lo que pudo generar errores de clasificación y sesgar los resultados.

El diagnóstico de FMMR continua siendo un desafío clínico, puesto que el inicio de síntomas es muy inespecífico, con la presencia de fiebre, cefalea y malestar general en los pacientes, lo cual semeja a enfermedades endémicas del estado de Sonora como influenza, dengue, chikungunya, zika y enfermedades febriles exantemáticas en general (Álvarez, 2013). En tal escenario, es importante la sospecha oportuna de FMMR y el escrutinio del médico de primer nivel de atención, lo que tiene un impacto relevante para el pronóstico clínico de la enfermedad, ya que cuestionando acerca de variables epidemiológicas ambientales y sociales como la proximidad con garrapatas o perros infestados con garrapatas, no únicamente podría iniciar el tratamiento con doxiciclina durante las primeras 72 horas de inicio de los síntomas, lo que reduciría la presencia de resultados fatales, sino que incrementaría la validez y confiabilidad de la PCR al tomar la muestra con mayor oportunidad y sin que se hubiera iniciado el antibiótico específico.



## CONCLUSIONES

1. La PCR convencional es un método diagnóstico confiable para confirmar infección por *Rickettsia rickettsii*, en muestras clínicas de sangre y suero de pacientes cursando los primeros 14 días de evolución de la enfermedad.
2. El uso de PCR convencional puede ampliarse a nivel poblacional para el diagnóstico precoz de pacientes con sospecha de fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* y puede ser una herramienta de uso rutinario en regiones endémicas de FMRR que cuenten con laboratorios de biología molecular.
3. La PCR convencional puede ser útil para confirmar el diagnóstico de FMRR en regiones endémicas que no cuenten con termocicladores para la PCR en tiempo real, reduciendo costos financieros en el proceso de las muestras.
4. Las muestras de sangre total, separando el paquete globular para la extracción del ADN, son mejores para el diagnóstico de FMRR mediante PCR convencional, principalmente porque las células mononucleares fagocitan y permiten la multiplicación de gran cantidad de bacterias. No obstante, no se debe descartar al sedimento del suero, especialmente cuando es la única muestra disponible, pues contiene material genético de las bacterias, de forma libre o extracelular.
5. La capacitación del personal médico es prioritaria, los mensajes claves deben incluir el reconocimiento del estado de Sonora como una región de alta endemia de FMRR, por lo que su escrutinio debe ir más allá de la búsqueda de signos clínicos; también es relevante que se insista en el inicio de doxiciclina durante los primeros días de inicio de síntomas; que se tome una muestra de sangre en los primeros días de evolución para confirmar el diagnóstico por PCR y que se notifique cada caso a los servicios de epidemiología.

## **Recomendaciones Metodológicas**

1. Para reducir la probabilidad de producción de dímeros, es conveniente optar por el precalentamiento (a 95°C por 5 minutos) para separar los iniciadores, previo a su adición en la mezcla de reacción, con lo que se mejora la capacidad de detección por electroforesis.
2. En las muestras sanguíneas de pacientes con uno o más días de tratamiento con doxiciclina, disminuye considerablemente la probabilidad de obtener resultados positivos. En estos pacientes, una forma de recuperar mayor cantidad de ADN para identificar los genes de *Rickettsia*, es aumentar de 5 µl a 8µl la cantidad de éste en la mezcla de reacción, sin alterar ningún otro reactivo. Lo mismo puede aplicar en las muestras de suero ya que por su naturaleza tendrá menor cantidad de ADN, lo que puede mejorar la capacidad de identificación de *R. rickettsii* y no producirá un resultado falso positivo en caso de ser negativa.
3. En condiciones críticas, cuando no sea posible tomar la cantidad (200 µl) necesaria para realizar la extracción de ADN, que es como se estandariza el proceso, cantidades menores como 100 µl de sangre total pueden ser útiles para realizar el diagnóstico. Para ello, recomendamos ajustar a la mitad los reactivos de la fase de lisis celular, y continuar con la extracción de ADN y el proceso normal de PCR.

## **Recomendaciones de Investigación**

1. En regiones de alta endemia de FMRR, como es el estado de Sonora, una tarea sustantiva de investigación es la secuenciación de las posibles cepas circulantes. Desde el punto de vista sanitario es relevante conocer las especies y cepas a las que la población se expone pues existen diferencias

clínicas y de salud. Un ejemplo de esto es *Rickettsia rickettsii* cepa 'Sheila Smith' (GenBank AADJ01000001) con un genoma completo de 1, 257,710 pb de ADN lineal que se ha identificado mediante secuenciación y hasta el momento es la cepa con más factores de virulencia (Clark, 2015; Paddock, 2015; Fournier, 2009). No obstante la elevada letalidad que se ha registrado en Sonora, no tenemos conocimiento de estudios que hayan buscado identificar o secuenciar la o las, cepas circulantes en Sonora.

2. También es fundamental que se desarrollen estrategias de investigación para el desarrollo de nuevas regiones blanco para identificar distintas especies de *Rickettsia*, sea para detectar genes que confieran mayor patogenicidad a la bacteria, o identificar la presencia de regiones genéticas que indiquen alguna mutación que afecte la sensibilidad al antibiótico de elección.
3. Es conveniente que se busquen métodos que mejoren la validez de PCR. Una alternativa por explorar es la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés). Esta metodología incluye seis iniciadores y una enzima isotérmica (no necesita cambios de temperatura, ni conservación estricta en temperaturas frías), por lo tanto no es necesario un termociclador. LAMP amplifica el ADN del patógeno en menor tiempo que PCR, al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez. Esto la convertiría en herramienta diagnóstica rutinaria en los hospitales, haciendo más ágil la toma de decisiones médicas.

## Recomendaciones de Políticas Públicas

1. La PCR convencional debe ser integrada en el inventario de herramientas diagnósticas de la fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en todas las unidades médicas del sistema de salud en Sonora.
2. Las muestras de sangre son la mejor opción para la confirmación de FMRR por PCR convencional. Es idóneo que la muestra se tome en los primeros 7 días de evolución de la enfermedad, pero no deben descartarse aquellas muestras de pacientes que tengan más de 8 días después del inicio de síntomas; también puede ser empleado el sedimento de suero. Esto debe incorporarse en los lineamientos operativos del programa estatal de prevención y control de la FMRR, y otros documentos normativos para el diagnóstico de la enfermedad.
3. Nuestro estudio sugiere que es necesario disminuir la tasa de rechazo de muestras sanguíneas y de suero, especialmente de pacientes críticamente enfermos con sospecha de FMRR, adecuando los criterios de aceptación establecidos en lineamientos federales y estatales, respecto a los días de evolución en los que se toma la muestra al paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Hernández G, Contreras-Soto JJ., Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del Estado de Sonora, 2004-2012. *Salud Pública Mex.* 2013; 55(2): 151-152.
- Alvarez-Hernandez G, Murillo-Benitez C, Candia-Plata MC, Moro M., Clinical profile and predictors of fatal Rocky Mountain spotted fever in children from Sonora, Mexico. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34(2): 125-130.
- Álvarez-Hernández G., González Roldán J.F., Hernández Milan N. S., Ryan Lash R., Barton Behravesh C., Paddock C.D. Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future; *The Lancet Inf Dis.* 2017; 17(6): 189-196.
- Álvarez-Hernández G, Roldán JFG, Milan NSH, Lash RR, Behravesh CB, Paddock CD. . Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future, *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(6): 189-196. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30173-1.
- Argüello AP, Hun L, Rivera P, Taylor L. Case report: a fatal urban case of Rocky Mountain spotted fever presenting an eschar in San José, Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(2): 345-348.
- Bassetti M., Ginocchio F., Mikulska M., Taramasso L. & Giacobbe D. Will new antimicrobials overcome resistance among Gram-negatives?, *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2011; 9(10):909-922.
- Biggs, HM, Behravesh, CB, Bradley, KK et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, ehrlichioses, and anaplasmosis-United States. *MMWR Recomm Rep.* 2016; 65:1-44.

- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff JR, Blanco G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinic Microbiol Infect.* 2004; 10: 1108-1132.
- Clark TR, Noriega NF, Bublitz DC, et al. Comparative Genome Sequencing of *Rickettsia rickettsii* Strains That Differ in Virulence. Morrison RP, ed. *Infection and Immunity.* 2015; 83(4): 1568-1576. doi:10.1128/IAI.03140-14.
- Crump JA, Corder JR, Henshaw NG, Reller LB. Development, implementation, and impact of acceptability criteria for serologic tests for infectious diseases. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 881.
- Delgado-de la Mora J, Licona-Enríquez JD, Leyva-Gastélum M, Delgado-de la Mora D, Rascón-Alcantar A, Álvarez-Hernández G. Una serie fatal de casos de fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora, México. *Biomédica.* 2018; 38(1): 69-76.
- Denison AM, Amin BD, Nicholson WL, Paddock CD., Detection of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* and *Rickettsia akari* in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay, *Clin Infect Dis.* 2014; 59(5): 635-42. doi: 10.1093/cid/ciu358
- Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 2007; 45(1): S45–51.
- Dumler JS, Walker DH., Rocky Mountain spotted fever--changing ecology and persisting virulence, *N Engl J Med.*, 2005; 353: 551-553. PMID:16093463. DOI:10.1056/NEJMp058138.
- Ellison DW, Clark TR, Sturdevant DE, Virtaneva K, Porcella SF, Hackstadt T. Genomic Comparison of Virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and Avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infection and Immunity.* 2008; 76(2): 542-550. doi:10.1128/IAI.00952-07.

- Eremeeva ME, Zambrano ML, Anaya L, Beati L, Karpaty SE, Santos-Silva MM et al. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *J Med Entomol.* 2011; 48(2): 418-421.
- Estripeaut D, Aramburú MG, Saez-Llores X, Thompson HA, Dasch GA, Paddock CD et al. Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(11): 1763-1765.
- Field-Cortazares, J and Seijo-y Moreno JL. Rickettsiosis en Baja California, *Bol Clin Hosp Infant Edo Son* 2011; 28: 44-50.
- Fournier P-E, El Karkouri K, Leroy Q, et al. Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in *Rickettsia* species may be explained by genome reduction. *BMC Genomics.* 2009; 10: 166. doi:10.1186/1471-2164-10-166.
- Fournier, P.E. and Raoult, D., Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann N Y Acad Sci.*, 2009; 1166: 1-11. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x.
- GBIF Secretariat (2016). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2017-08-23.
- J. Stephen Dumler, M.D., and David H. Walker, M.D., Rocky Mountain Spotted Fever Changing Ecology and Persisting Virulence, *N Engl J Med.* 2005; 353: 551-553. DOI: 10.1056/NEJMp058138
- Kato CY, Chung IH, Robinson LK, Austin AL, Dasch GA, Massung RF. Assessment of Real-Time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 314-317.
- La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(11): 2715-27.

- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(1): 90-98.
- Leal CA, Carvalho-Castro GA, Cottorello AC, Leite RC, Figueiredo HC. Comparative analysis of conventional PCR and real-time PCR to diagnose shrimp WSD. *Braz J Microbiol*. 2013; 44(3):901-904.
- Linhart C., Shamir R., The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications, *J Comput Biol*. 2005; 12(4): 431-456
- Masters EJ, Olson GS, Weiner SJ, Paddock, CD, Rocky Mountain Spotted Fever, A Clinician's Dilemma, *Arch Intern Med*. 2003;163:769-774
- Oteo JA, Nava S, de Sousa R, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las Rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Rev Chil Infectol*. 2014; 31(1): 54-65.
- Paddock C.D., Denison A., Ryan L.R., Liu L., Bollweg B.C., Scott D., Kanamura T.C., Angerami N.R., Pereira D.F., Brasil M. R., and Karpathy S.E., Phylogeography of *Rickettsia rickettsii* Genotypes Associated with Fatal Rocky Mountain Spotted Fever, *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 91(3): 589-597. doi:10.4269/ajtmh.14-0146
- Paddock C.D., Perspectives on the laboratory diagnosis of rickettsial diseases in the 21<sup>st</sup> century, *Acta Méd Costarri*, 2013; 55(suppl 1): 13-24.
- Paddock CD, Álvarez-Hernández G. *Rickettsia rickettsii* (Rocky Mountain spotted fever). En: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, Fifth Edition. Eds. Sarah S. Long, Charles G. Prober, and Marc Fischer. Elsevier. United States. ISBN: 978-143-7727-0-29.
- Rathi N.B., Rathi A.N., Goodman M.H., Aghai Z.H. Rickettsial diseases in central India: proposed clinical scoringsystem for early detection of spotted fever. *Indian Pediatr*. 2011; 48(11): 867-72.



- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 1991; 173(5): 1576-1589
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* .1997;47: 252–261.
- Rozental T, Ereemeeva ME, Paddock CD, Zaki SR, Dasch GA, Lemos ERS. Fatal case of Rocky Mountain spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1078: 257-259
- Sahni SK, Narra HP, Sahni A, Walker DH. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future microbiology.* 2013; 8(10): 1265-1288. doi:10.2217/fmb.13.102.
- Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 17(2):286-90.
- Servicios de Salud Sonora. Cierre Anual del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector, 2011; Hermosillo, México. 2012
- Sexton DJ, Kanj SS, Wilson K, Corey GR, Hegarty BC, Levy MG et al. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50:59-63.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Epidemiológico “Actualización en la vigilancia epidemiológica de Rickettsiosis”. Sistema Único de Información. Secretaría de Salud 2010; 27 (6): 1-4.

- Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J Clin Microbiol.* 1989;27: 2866–2868.
- Uchiyama T. Tropism and Pathogenicity of Rickettsiae. *Front in Microbiol.* 2012; 3: 230. doi:10.3389/fmicb.2012.00230.
- Yasuyoshi M., Hidetoshi K., Tsugunori N., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development, *J Infect Chemother*, 2013;18 (3) 404-411 <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0590-0>.
- Ye J, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012; 13: 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134
- Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, Arias-León JJ, Walker DH, Zavala-Velazquez JE. An increase in human cases of spotted fever Rickettsiosis in Yucatan, Mexico involving children. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(6): 907-910.

## APENDICE

### Preparación de Reactivos

1. **Deoxinucleótidos 2.5 mM:** En un microtubo de 0.5 mL estéril, colocar 5  $\mu$ L de cada deoxinucleótido (100 mM) y agregar 180  $\mu$ L de agua deionizada estéril.
2. **Iniciadores (CS-F, CS-R, RRI-F y RRI-R):** Los viales comerciales se resuspenden en agua deionizada estéril para ajustarse a una concentración de 100  $\mu$ M. Diluir 1:5, por ejemplo 80  $\mu$ L de agua + 20  $\mu$ L de primer, para obtener una concentración final de 20  $\mu$ M.  
**CS-F** (5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3)  
**CS-R** (5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3)  
**RRI-F** (5'-AAATCAACGGAAGAGCAAAAC-3)  
**RRI-R** (5'-CCCTCCACTACCTGCATCAT-3)
3. **EDTA 0.5 M, pH 9.0:** Disolver 93.05 g de EDTA (dihidratado) en 400 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 9.0 con NaOH sólido (aprox. 20 g de NaOH). Aforar a 500 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave. Se disuelve a pH cercanos a 8.
4. **TBE 5X (Tris, Ácido bórico y EDTA), pH 8.0:**
  - a) Disolver 54 gramos de tris base en 800 mL de agua destilada
  - b) Agregar 27.5 gramos de ácido bórico
  - c) Agregar 20 mL de EDTA 0.5 M
  - d) Ajustar el pH a 8.0 utilizando HCl
  - e) Aforar a 1000 mL
  - f) Esterilizar en autoclave
5. **Buffer de corrida PFGE (TBE 1 X):** Diluir 130 mL de buffer TBE 5X en 520 mL de agua deionizada.

**6. GELSTAR®:** Diluir 1:10 el reactivo comercial GELSTAR®, con agua deionizada estéril.

1. Añadir 500 µL de solución AW2, centrifugar 3 minutos a 20,000 x g (14,000 rpm) descartar el tubo colector con el líquido
2. Colocar la columna sobre un microtubo de 1.5 mL nuevo
3. Añadir 200 µL de solución AE en el centro de la columna
4. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugar 1 minuto a 6,000 g (8,000 rpm).
5. Descartar la columna y cerrar el microtubo con el ADN obtenido.
6. Guardar a -20°C hasta su uso. (2011. Quick-StartProtocol. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. QIAGEN.)