

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estimación de la Confiabilidad de un Esquema de PCR para Detectar Infección por
Rickettsia rickettsii en Muestras de Hisopado Cutáneo y Orina



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Cynthia Yadira García Cortez

Hermosillo, Sonora

Enero de 2020

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



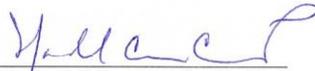
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Cynthia Yadira García Cortez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Gerardo Álvarez Hernández
Presidente



Dra. María del Carmen Candia Plata
Secretaria



Dr. Enrique Bolado Martínez
Sinodal



Dr. Miguel Ángel Martínez Medina
Sinodal

A **CONACYT** por su impulso para realizar investigación y el apoyo para desarrollar éste y muchos trabajos. A la **Universidad de Sonora junto con la Coordinación de Posgrado en Ciencias de la Salud** por la oportunidad de desarrollar mi proyecto para lograr el grado de Maestría.

Al **Dr. Gerardo Álvarez Hernández**, director de éste trabajo, por la confianza que me otorgó de trabajar en este proyecto tan importante para él, por toda su experiencia y conocimientos compartidos.

A mis sinodales, **Dr. Enrique Bolado Martínez, Dra. Maria del Carmen Candia Plata y Dr. Miguel Ángel Martínez Medina**, por sus observaciones, consejos y por su valioso tiempo dedicado a éste trabajo.

Un agradecimiento especial a la **M. en C. Marcia Leyva Gastélum** por toda su invaluable ayuda para el análisis de resultados y por guiarme a lo largo de todo éste proceso.

A las **Dras. Angélica Encinas y Denisse Rivera** del Hospital Infantil del Estado de Sonora por su oportuna ayuda y disposición en la obtención de las muestras clínicas.

Al **Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora (LESPSON)**, en especial a las áreas de Biología Molecular y de Recepción de muestras por ser intermediarios en la recolección de las muestras clínicas.

A los Técnicos Académicos y compañeros del **Laboratorio de Biología Molecular de la UNISON**, por todo su apoyo en el manejo de equipos, instrumentos y por su compañía en las largas jornadas de trabajo.

A mi familia y amigos por su apoyo emocional y sus buenas vibras que llegué a necesitar en éste trayecto..... **Gracias a Dios por la Vida y la Salud.**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
OBJETIVOS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
Generalidades de <i>Rickettsia</i> spp	3
Patogenia y transmisión de <i>Rickettsia</i> spp y <i>Rickettsia rickettsii</i>	3
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	4
Epidemiología de <i>Rickettsia</i> spp y <i>Rickettsia rickettsii</i>	5
Identificación de <i>Rickettsia</i> spp <i>Rickettsia rickettsii</i>	6
Planteamiento del problema y justificación	6
Hipótesis	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Generalidades	10
Sitio y sujetos de estudio	10
Tipo y tamaño de la muestra	10
Procedimientos de recolección de datos	11
Información clínica	11
Procedimiento de recolección de las muestras biológicas	11
Procesamiento de las muestras	12
Plan de análisis	13
Consideraciones éticas	15
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	36

Recomendaciones	36
BIBLIOGRAFÍA	37
APÉNDICES	43

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Distribución mundial de especies de <i>Rickettsia</i> spp	7
II	Medidas de acuerdo para datos categóricos	16
III	Características seleccionadas de pacientes con sospecha de FMRR por tipo de muestra	18
IV	Características seleccionadas de pacientes con sospecha de FMRR con orinas positivas o negativas	20
V	Características seleccionadas de pacientes con sospecha de FMRR con hisopados positivos o negativos	21
VI	Coefficiente de Kappa e intervalo de confianza calculado para orina e hisopado	23

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Resultados de PCR en orinas comparadas con PCR en sangre Total	14
2	Lesión tipo escara provocada por la mordedura de la garrapata en un paciente con FMRR	22
3	Muestras de pacientes con sospecha de FMRR según mes de la toma y resultado	24
4	Porcentaje de positividad de pacientes con sospecha de FMRR según grupo de edad	25
5	Porcentaje de positividad de pacientes con sospecha de FMRR según días de evolución	27
6	Porcentaje de positividad de muestras de pacientes con sospecha de FMRR según turno laboral de muestreo	28
7	Porcentaje de positividad de muestras de pacientes con sospecha de FMRR tomadas con y sin retraso en el tratamiento antibiótico	29
8	Porcentaje de positividad de muestras de pacientes con sospecha de FMRR tomadas en distintas unidades médicas	30
9	Municipios de Sonora donde se recolectaron muestras de orina e hisopado cutáneo	31

OBJETIVOS

Objetivo General

Estimar la confiabilidad de un esquema de PCR en muestras de hisopado cutáneo y orina de pacientes con sospecha de infección por *Rickettsia rickettsii*, atendidos en hospitales públicos de Sonora, comparando los resultados con los obtenidos en muestras de sangre total.

Objetivos Particulares

1. Integrar dos grupos de pacientes que requieren atención hospitalaria: Grupo I, pacientes con diagnóstico clínico de fiebre manchada; Grupo II, pacientes con exantema febril pero sin sospecha clínica de fiebre manchada.
2. Determinar la confiabilidad de un esquema de PCR que ha mostrado ser confiable para identificar infección por *Rickettsia rickettsii* en muestras sanguíneas, ensayando muestras de hisopado de piel y muestras de orina de pacientes hospitalizados.

RESUMEN

La fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR) es transmitida en México por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* y la prueba estándar de oro para confirmarla es la inmunofluorescencia indirecta, de limitado valor clínico. Diversos esquemas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son una alternativa para confirmar el diagnóstico en sangre total, pero se desconoce su valor diagnóstico en muestras como el hisopado cutáneo y la orina. El objetivo de este trabajo es evaluar la confiabilidad de un esquema de PCR en muestras de hisopado cutáneo y orina, en pacientes con sospecha de infección por *R. rickettsii*. Para ello, se realizó un estudio transversal en pacientes con diagnóstico presuntivo de FMRR atendidos en hospitales públicos de Sonora entre el 20 de septiembre de 2018 y el 31 de octubre de 2019. Los resultados de PCR de muestras de hisopado cutáneo y orina se contrastaron con PCR en sangre total. La confiabilidad del esquema fue estimada con el coeficiente de Kappa (K).

En 72 muestras de orina procesadas, 21 fueron positivas a *R. rickettsii* y 2 muestras positivas a *Rickettsia* spp, con una $K=0.615$, IC95% (0.386, 0.8436), considerándose una confiabilidad buena para este tipo de muestra. Por lo que respecta a los hisopados cutáneos, se identificaron 3 positivos a *R. rickettsii* en 7 muestras procesadas; el coeficiente de confiabilidad (K) fue de 0.417, aunque sin significancia estadística pues el IC95% fue de (-0.338, 1.172).

Nuestro estudio puede contribuir positivamente a mejorar la capacidad y oportunidad diagnóstica de la FMRR en regiones de alta endemia. También puede representar una línea basal para continuar la investigación en México, con muestras no invasivas para el diagnóstico de FMRR.

INTRODUCCIÓN

La fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR) es una enfermedad aguda producida por la bacteria del mismo nombre, transmitida por la mordedura de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, principal vector de la enfermedad en México y es común encontrarla en el perro (Eremeeva y col., 2011). La FMRR es un problema de salud pública en Sonora por su elevada letalidad y con un comportamiento epidémico que provoca unos 100 casos anuales y entre 20 y 40% de fallecimientos (Hernández y col., 2013; Alvarez y col., 2015). Su letalidad es superior a otras enfermedades infecciosas endémicas de la región como influenza (10%), tosferina (8%) y tuberculosis (5%) (Alvarez y col., 2017).

Sus complicaciones y resultados fatales pueden prevenirse si se comienza oportunamente el tratamiento antibiótico específico, principalmente con doxiciclina. Alcanzar este propósito es difícil, porque los síntomas iniciales son poco específicos y semeja diversos padecimientos endémicos y el diagnóstico se corrobora hasta 4 semanas después del comienzo de síntomas mediante la detección de anticuerpos IgM e IgG por inmunofluorescencia indirecta (IFI) cuando el paciente se ha recuperado o ha fallecido (La Scola y col., 1997; Biggs y col., 2016).

Dada la magnitud y severidad de la enfermedad, se ha recomendado a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como una alternativa diagnóstica útil, oportuna y confiable para la confirmación de FMRR, especialmente cuando se prueba en diversas muestras biológicas como sangre total, suero, tejidos o biopsia de piel. PCR ha sido implementada en Laboratorios de Referencia de México para la identificación de *Rickettsia* (Secretaría de Salud, 2017; Bechah y col., 2011).

Aunque PCR es un método útil para confirmar el diagnóstico en muestras de sangre total durante los primeros días de la enfermedad, es necesario evaluar muestras biológicas obtenidas mediante métodos menos invasivos como el hisopado cutáneo y la muestra de orina, que además tengan capacidad para confirmar casos en menor tiempo que la IFI (Bechah y col., 2011). El método de PCR ya se encuentra disponible en

algunos centros de investigación en Estados Unidos y Latinoamérica. En México, el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) tiene capacidad para identificar el género *Rickettsia* en muestras de sangre total, pero no tenemos conocimiento de que se haya evaluado la confiabilidad diagnóstica del método en muestras de hisopado cutáneo, ni tampoco en orina, en pacientes con sospecha de FMRR (Biggs y col., 2016).

Por lo anterior, este proyecto pretende examinar la confiabilidad clínica de la prueba de PCR en muestras de hisopado cutáneo y de orina en pacientes con sospecha de FMRR atendidos en hospitales públicos de Sonora, y con ello, contribuir a mejorar la capacidad diagnóstica de esta enfermedad. Esto es crítico 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 (Alvarez y col., 2015).

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Generalidades de *Rickettsia spp*

Se conoce como Rickettsiosis a un grupo de enfermedades causadas por bacterias del género *Rickettsia*, que presentan entre sí similitudes clínicas; en México se presenta la enfermedad en prácticamente todo el país (Zavala y col., 2000). Las rickettsias son cocobacilos Gram (-), intracelulares obligados. Su blanco primario de infección en huéspedes mamíferos son las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos. Se multiplican en el citosol y ocasionalmente en el núcleo de las células infectadas mediante fisión binaria en un período de 8-10 horas (Secretaría de salud, 2017).

Las rickettsias de mayor importancia epidemiológica son: 1) *Rickettsia rickettsii* agente de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas transmitida por diversas especies de garrapata; 2) *Rickettsia prowazekii* agente del tifus epidémico, su vector principal es *Pediculus humanus humanus*, el piojo del cuerpo humano y 3) *Rickettsia typhi*, causante del tifus murino o endémico, los roedores son su principal reservorio y los principales vectores son *Xenopsylla cheopis* y *Ctenocephalides felis*, las pulgas de rata y gato, respectivamente (De Lara y col., 2008).

Patogenia y Transmisión de *Rickettsia spp* y *Rickettsia rickettsii*

Los humanos son hospedadores ocasionales de las garrapatas y raramente juegan un papel en la transmisión subsecuente de la bacteria. La infección inicial de las garrapatas infectadas con *Rickettsia* ocurre cuando las no infectadas se alimentan de hospederos rickettsémicos. La probabilidad de ser infectado aumenta con la cantidad de sangre que la garrapata ingiere y la duración de la adhesión. El contacto con los aerosoles que se generan con garrapatas aplastadas o con animales infectados de rickettsias, pueden ser medios de infección cuando se exponen heridas externas u otras laceraciones. No existe transmisión de persona a persona (Minichová y col., 2017).

Las rickettsias patogénicas son capaces de invadir células endoteliales microvasculares de pequeños y medianos vasos sanguíneos, para así ganar acceso al

citoplasma rico en nutrientes, crecer y diseminarse dentro del huésped mamífero. Consecuentemente, la vasculitis atribuida a la activación endotelial, inflamación, daño y la perturbación de la función de la barrera microvascular, produce un desequilibrio de fluidos, edema pulmonar y cerebral, así como secreción de citocinas y quimiocinas como defensa del huésped (Clifton y col., 2005).

Generalmente los síntomas característicos de las rickettsiosis son fiebre, dolor muscular, vasculitis como erupción y en ocasiones la formación de una lesión necrótica tipo escara en el lugar de la inoculación; pero su importancia médica en México aún es incierta y no es clara su carga de morbilidad y complicaciones médicas. El abanico sintomático de diversas rickettsiosis es amplio e incluye una variedad de distinta severidad clínica. Los pacientes que sobreviven quedan inmunizados (Bernabeu y col., 2005).

Rhipicephalus sanguineus

La garrapata marrón, *R. sanguineus sensu lato* es un artrópodo ectoparásito hematófago de la familia *Ixodidae*, que en México, infesta preferentemente a los perros, aunque también puede parasitar a otros animales domésticos, salvajes e incluso ocasionalmente al humano. Es una especie cosmopolita, pero es más común en climas cálidos. Originaria de África, actualmente se encuentra en todo el mundo, a excepción de las zonas con un clima inferior a 7° C. Es posible que esta especie sea endémica todo el año, ya que puede completar la totalidad de su ciclo de vida en interiores. *R. sanguineus* es la única especie del género *Rhipicephalus* registrada en América (Dantas Torres, 2008).

Las condiciones ambientales que favorecen la transmisibilidad de la garrapata *R. sanguineus* incluyen rezago social, calentamiento global, deforestación, aumento de huéspedes competentes (p.ej perros) que están en contacto directo con las personas, invasión humana de entornos silvestres y la inadecuada urbanización. (Walker y col., 2008). En cuanto a los cambios climáticos, se sabe que el calentamiento tiene un impacto en la actividad y la agresividad de la garrapata marrón del perro *R. sanguineus*

(sensu lato), aumentando los ataques a humanos y la posibilidad de transmisión de rickettsiosis severas (Tomassone y col., 2018).

A diferencia de la mayoría de las garrapatas, las del género *Rhipicephalus* poseen un geotropismo negativo, los adultos evitan ocultarse en el suelo. Si llegasen a caer de su hospedero, buscarán lugares altos, como pastos altos, paredes, grietas, a fin de caer sobre un hospedador potencial, después de percibir el bióxido de carbono o mediante el calor corporal emitido por el animal en cuestión (Muñoz y col., 2002).

Epidemiología de *Rickettsia* spp y *Rickettsia rickettsii*

La rickettsiosis reemergió durante la 1° guerra mundial. Durante la 2° guerra mundial la enfermedad se presentó en el Norte de África, el sur de Italia, zona este y centro de Europa, en donde se presentaron epidemias en los campos de concentración. Se han descrito brotes actualmente en África central. También son reportados casos esporádicos en algunos países como Perú y algunas zonas del Norte de África, así como en Rusia y los Estados Unidos, donde las infecciones han sido documentadas en personas que han tenido contacto con ardillas voladoras (Alejandro y col., 2008).

Hasta el final del siglo pasado, sólo se conocían tres especies de *Rickettsia* en Latinoamérica y el Caribe: *R. rickettsii*, *R. prowazekii*, y *R. typhi*. Desde 1990, se descubrieron nuevas especies en el continente, como *R. africae* en West Indies, *R. felis* en México y más tarde en Brasil. En este siglo se generó gran interés en el estudio de *Rickettsia* en Latinoamérica, con el descubrimiento de al menos ocho especies nuevas en diez años, la mayoría asociadas con garrapatas: *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *R. akari*, *R. monteiroi*, y Candidatus *R. andeanae* (Labruna y col., 2011).

De las tres especies (*R. rickettsii*, *R. prowazekii*, y *R. typhi*) conocidas en el continente americano durante la primera mitad del siglo pasado, sólo *R. rickettsii* ha mostrado un incremento en su distribución durante las últimas décadas. De hecho, la FMRR es considerada una enfermedad reemergente en México, Centro y Sudamérica. Para El Salvador, Honduras y Nicaragua, hasta ahora no se han reportado especies

de *Rickettsia*, pero si hay evidencia serológica de infección humana y/o animal. Sin reportes de infección por *Rickettsia* permanecen: Belice, Venezuela, Guayana, Surinam y Paraguay. Además, a excepción de algunas islas del Caribe, muchas de ellas permanecen sin reportes (Alejandro y col., 2008).

En la tabla I se muestra la distribución mundial de las distintas especies de *Rickettsia* (Saah y col., 1997).

Identificación de *Rickettsia* spp y *Rickettsia rickettsii*

El diagnóstico de la FMRR es difícil dado que no se presentan manifestaciones específicas tempranas que distingan a la enfermedad. La sospecha temprana se basa en la identificación empírica de signos y síntomas, y por su asociación con variables epidemiológicas. Para confirmar la infección, se utilizan los siguientes métodos:

1. Evidencia serológica por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de un incremento de cuatro veces en los títulos de los anticuerpos reactivos a *R. rickettsii*, en sueros pareados que se toman entre el 7° y el 21° día tras el comienzo de los síntomas.
2. Demostración de antígeno de *R. rickettsii* por prueba inmunohistoquímica en una muestra clínica como una biopsia de piel u otro tejido.
3. Detección de DNA de *R. rickettsii* a través de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en una muestra como sangre o tejido.
4. Aislamiento de *R. rickettsii* de una muestra clínica en un cultivo celular, obtenidos por una prueba estandarizada (Chapman y col., 2006).

Planteamiento del Problema y Justificación

La confirmación de la FMRR por los métodos de laboratorio convencionales es difícil, por la inespecificidad inicial de signos y síntomas, por lo que se confunde con otros padecimientos febriles endémicos en Sonora como algunas arbovirosis, hepatitis e incluso algunos cuadros respiratorios agudos (Alvarez y col., 2017). En adición a tal dificultad, la muestra biológica de mayor valor es la sangre total para la determinación

Tabla I. Distribución mundial de especies de *Rickettsia* spp.

Enfermedad	Etiología	Distribución	Artrópodo	Vertebrado	Exantema
Fiebres manchadas					
Fiebre de las Montañas Rocosas	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Hemisferio occidental	garrapata	Roedores salvajes, perros	Tronco, extremidades
Fiebre botonosa	<i>Rickettsia conorii</i>	Africa, Mediterráneo India	garrapata	Roedores salvajes, perros	Tronco, extremidades Cara
Grupo del tifus					
Tifus epidémico	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Sudamérica Africa, Asia, USA?	Piojo del cuerpo	Hombre, Ardilla voladora	Tronco a extremidades
Brill-Zinsser	<i>Rickettsia prowazekii</i>	En todo el mundo	ninguno	Hombre(recurrencia del tifus)	Tronco a extremidades
Tifus murino	<i>Rickettsia typhi</i>	En todo el mundo	pulga	Pequeños roedores	Tronco a extremidades

Fuente: Saah y col., 1997

serológica de Anticuerpos IgG, mediante IFI. En escenarios clínicos es complicada la obtención de muestras de sangre total en pacientes con más de 5 días de evolución de la enfermedad, debido a la presencia de plaquetopenia, misma que puede asociarse a la ocurrencia de sangrado y extravasación de líquidos. Además, la toma sanguínea tiene una naturaleza invasiva y es posible que en los pacientes con más de 1 día de tratamiento antibiótico, tenga un valor limitado para identificar ADN de la bacteria mediante la técnica de PCR (Bechah y col., 2011).

La técnica de PCR amplifica secuencias de ADN y se ha utilizado para el diagnóstico de *R. rickettsii* en países como Estados Unidos (Sexton y col., 1994), Brasil (Rozenal y col., 2006), Panamá (Estripeaut y col., 2007), Costa Rica (Argüello y col., 2012) y México (Zavala y col., 2008), aunque útil, no se ha evaluado la validez clínica del método a nivel poblacional, y al momento, sólo ha sido probada en pequeños estudios de investigación. Aunque PCR es un método útil para confirmar el diagnóstico en muestras de sangre total durante los primeros días de la enfermedad, es necesario evaluar muestras biológicas obtenidas mediante métodos menos invasivos como el hisopado cutáneo y muestra de orina, que además tengan capacidad para confirmar casos en menor tiempo que la IFI, como parece garantizar la PCR (Bechah y col., 2011).

En México, el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) tiene capacidad para identificar el género *Rickettsia* en muestras de sangre total, pero no tenemos conocimiento de que se haya evaluado la capacidad diagnóstica del método en muestras de hisopado cutáneo, ni tampoco en orina, en pacientes con sospecha de FMRR, aunque ya se ha documentado que en otras infecciones rickettsiales (p.e. *Ehrlichia chafeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*) tiene una sensibilidad que oscila entre 52 y 87% (Biggs y col., 2016; Oteo y col., 2014).

En algunos países como Francia (Bechah y col., 2011), Estados Unidos (Biggs y col., 2016) y Brasil (Gomes y col., 2017), se ha evaluado el uso de hisopado cutáneo para el diagnóstico de Rickettsiosis del grupo de fiebres manchadas. En México, sin embargo, el uso de este material biológico para el diagnóstico de FMRR no ha sido

evaluado, por lo que es conveniente que se examine su capacidad diagnóstica en un escenario de alta endemia como es el estado de Sonora.

Por otra parte, la orina ha sido durante mucho tiempo un biofluido favorecido según los investigadores de metabolómica. Es estéril, fácil de obtener en grandes volúmenes, como material de desecho biológico, la orina típicamente contiene productos de degradación metabólica de una amplia gama de alimentos, bebidas, medicamentos, contaminantes ambientales, metabolitos residuales endógenos y subproductos bacterianos; muchos de estos compuestos están pobremente caracterizados y mal entendidos (Bouatra y col., 2013).

Varios estudios han establecido el uso de la muestra de orina como una alternativa útil y no invasiva para la detección de diversas infecciones, como Virus del Papiloma (Combita y col., 2016), Zika Virus (Gourinat y col., 2015), Leptospirosis (Bal y col., 1994), Tuberculosis (Gopinath y col., 2009), entre otras. En 1994 en Estados Unidos se probó la PCR en 15 muestras de sangre y orina de pacientes con sospecha de fiebre manchada de los cuáles 4 resultaron positivos en sangre y 1 positivo en orina (Sexton y col., 1994). Es importante señalar que la presencia de ADN en la orina indica una infección viable y por lo tanto, potencialmente es posible esperar evidencia de una infección rickettsial en dicho material biológico (Bouatra y col., 2013).

Por lo anterior, este proyecto pretende examinar la confiabilidad clínica de la prueba de un esquema de PCR, que ha demostrado ser confiable en muestras sanguíneas, en muestras de hisopado cutáneo y de orina en pacientes con sospecha de FMRR atendidos en hospitales públicos de Sonora. El proyecto podrá contribuir a mejorar la capacidad diagnóstica de esta enfermedad que existe en el estado (Alvarez y col., 2015).

Hipótesis

El método de PCR que ha sido utilizado para identificar infección por *R. rickettsii* en la sangre de pacientes del estado de Sonora, es una prueba confiable en muestras de hisopado cutáneo y de orina comparada con la técnica de PCR en muestras de sangre total, para detectar la infección por *R. rickettsii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades

Se realizó un estudio transversal para estimar la confiabilidad de la prueba PCR para detectar *Rickettsia rickettsii* en muestras de hisopado cutáneo y muestras de orina en pacientes con sospecha clínica de fiebre manchada que recibieron atención en hospitales públicos de Sonora entre el 20 de septiembre de 2018 y el 31 de Octubre de 2019. Para contrastar la técnica de PCR en ambas muestras biológicas, se usó como referencia a la determinación de PCR en muestras sanguíneas. Antes de su ejecución, todos los procedimientos del estudio recibieron dictamen favorable por el Comité de ética en investigación del departamento de Medicina de la Universidad de Sonora.

Sitio y Sujetos de Estudio

El proyecto se enfocó a pacientes de los hospitales públicos del Estado de Sonora, que funcionan como centros de referencia para la atención de pacientes con diagnóstico presuntivo de FMRR, procedentes de toda la entidad. Sonora tiene una población estimada para el año 2014 de 2'892,464 habitantes. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), poco más del 51% de individuos tiene 19 años de edad o menos. Del total de población, 36.1% no cuenta con servicios de seguridad social; en este grupo poblacional, se concentra poco más de dos tercios del total de la incidencia de FMRR (Alvarez y col., 2015; Sonora, 2011).

Tipo y Tamaño de Muestra

Se empleó un muestreo no probabilístico de 110 sujetos; de ellos, 79 (Grupo I) tuvieron sospecha clínica de fiebre manchada (CIE-10 A77.9), quienes recibieron el diagnóstico en hospitales públicos del estado de Sonora, mismos que fueron comparados con un grupo de 31 sujetos sin sospecha de la enfermedad (Grupo II), pero que presentaron síndrome febril infeccioso agudo de al menos de 5 días de evolución, causado por un

agente distinto a FMRR, particularmente pacientes con sospecha de padecimientos febriles exantemáticos endémicos en la región como dengue.

Procedimientos de Recolección de Datos

Información Clínica

La información clínica de los sujetos elegidos se obtuvo a través del cuestionario “Estudio Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores” (Apéndice 1) empleado regularmente en el Sistema Nacional de Salud para el registro de casos de la enfermedad, el cual fue complementado con la exploración física que buscó intencionadamente signos y síntomas sugestivos de FMRR. Esta valoración fue efectuada por médicos de los hospitales involucrados, cegados a los propósitos del estudio.

Procedimientos de Recolección de las Muestras Biológicas

Para ser elegibles, los pacientes debieron haber recibido un diagnóstico presuntivo de fiebre manchada, establecido por valoración médica y epidemiológica, también debieron contar con una hoja de consentimiento informado firmada (Apéndice 2) o de asentimiento (Apéndice 3), en el caso de menores de edad. Lo mismo se solicitó para los sujetos del grupo II. Para propósitos de la evaluación de la prueba de PCR, con la muestras de hisopado cutáneo, se humedeció la lesión maculopapular, vesícula o escara con una gasa con solución salina estéril, girando vigorosamente un hisopo de dacrón o rayón estéril en la base de la lesión de 5 a 6 veces en un ángulo de 50° a 60° y se retiró la costra cuando fue posible; el hisopo se colocó en un tubo estéril de plástico con solución salina estéril y con tapa. (Secretaría de Salud, 2017). La muestra se tomó la primera semana de síntomas y antes del inicio del tratamiento con doxiciclina. Si la situación del paciente era muy grave o crítica, la muestra se tomó al momento de la sospecha diagnóstica (La Scola y col., 1997).

La muestra de orina se tomó directamente del chorro urinario (20 a 30 mililitros), depositándola en el interior de un recipiente estéril y desechable, debidamente etiquetado para su identificación. Se examinó la orina antes de transcurridas 24 horas de su toma, como se recomienda (Salinas y col., 2008).

Todas las muestras se transportaron en red fría, hacia el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sonora, donde se procesaron en un lapso menor a 24 horas después de la toma de muestra (Brouqui y col., 2004).

Procesamiento de las Muestras

La extracción del ADN se llevó a cabo con el instrumento de extracción automatizado Magna Pure Compact LC 2.0 de Roche®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Antes de colocar las muestras en el instrumento de extracción, éstas recibieron tratamiento previo: la orina se centrifugó 30 minutos a 4,000 rpm y se tomaron 200 µL del sedimento; la sangre se dejó reposar 30 minutos con proteinasa K.

La PCR convencional para diagnosticar el género *Rickettsia* identificando el gen *gltA* y la proteína hipotética A1G_04230, que es el gen específico para especie, 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 (pb) del gen citrato sintasa (*gltA*) para género y los iniciadores RRi1(F) y RRi2(R) (0.8 µM), para amplificar un fragmento de 153 pb de la proteína A1G_04230 para la especie *rickettsii*; agregando en ambas reacciones MgCl₂ (3 mM), oligonucleótidos (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.

Las condiciones de los ciclos de PCR para género 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 y col., 2004). Las condiciones de los ciclos de PCR para especie 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 (Kato y col., 2013).

Los productos de amplificación de ambas PCR, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%(p/v) en buffer TBE 1X (Tris 50 mM, ácido bórico 40 mM, EDTA 0.5 M), con el colorante Gel Star dilución 1:10 (Lonza U.S.A.), 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 Total Lab (U.S.A.) (Figura 1).

Plan de Análisis

Como primer paso, se utilizó estadística descriptiva para comparar características sociodemográficas y clínicas entre el grupo de sujetos con diagnóstico de FMRR, que fue categorizado en pacientes con muestras de orina y aquellos con hisopado, y el grupo de comparación; las diferencias fueron examinadas mediante prueba de Chi-cuadrada (variables categóricas) y ANOVA o U de Mann-Whitney (variables continuas). Se probaron hipótesis a dos colas y valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativas.

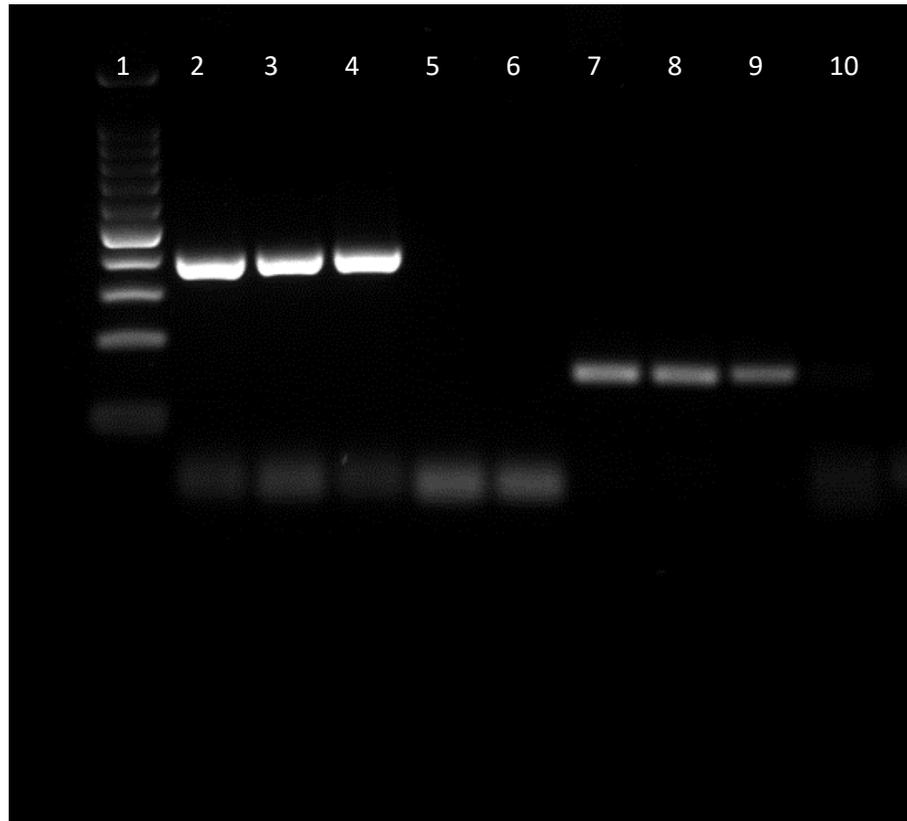


Figura 1. Bandas de amplificación de los genes *gltA* y proteína A1G_04230. Carril 1: Marcador de 100 pb; carril 2: control positivo a género gen *gltA* (401 pb); carril 3: muestra de sangre positiva a género; carril 4: muestra de orina positiva a género; carril 5: control negativo de PCR; carril 6: blanco de PCR; carril 7: control positivo a especie gen de la proteína A1G_04230 (153 pb); carril 8: muestra de sangre positiva a especie; carril 9: muestra de orina positiva a especie; carril 10: control negativo de PCR.

Para estimar la confiabilidad clínica de PCR de hisopado cutáneo y de orina, se compararon los resultados de la prueba con los obtenidos mediante PCR en sangre total. Un resultado de PCR se consideró positivo cuando se observó la presencia de una banda con un número de pares de bases acorde con el tamaño esperado para cada uno de los genes amplificados: Citrato sintasa *gltA*, 401 pb (Labruna y col., 2004) y la proteína hipotética A1G_04230, 153 pb (Kato y col., 2013). La confiabilidad de la prueba PCR se examinó mediante el cálculo del coeficiente de Kappa (K) (Cerdea y col., 2008), de acuerdo al siguiente estadístico:

$$K = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

Donde Pr (a) es el resultado de concordancia observada, y Pr (e) es el resultado de la concordancia ajustando el azar.

Para propósitos de interpretación del coeficiente de Kappa, se empleó la tabla de valores propuesta originalmente por Landis (Tabla II), (Landis y col., 1977).

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 fuera incluido en la investigación, el respeto a las decisiones que pueden tomar todos los niños y adolescentes en edad escolar (≥ 7 años) fue rigurosamente observado. Cuando las condiciones clínicas fueron un impedimento para conseguir el asentimiento del menor, su tutor responsable debió tomar la decisión, buscando el beneficio del sujeto elegido. Para garantizar la privacidad del paciente, ningún resultado obtenido será objeto de publicación a nivel individual, y solamente se divulgarán en medios científicos (p.e. congresos, seminarios, revistas). Ninguna de las muestras biológicas que se obtuvieron

Tabla II. Medidas de acuerdo para datos categóricos.

Kappa	grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
>0,00 - 0,20	Insignificante
0,21 - 0,40	Discreto
>0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Sustancial
0,81 - 1,00	casi perfecto

Fuente: Landis y col., 1977.

de los sujetos participantes podrá ser utilizada en otros estudios sin la autorización explícita de los mismos. Todos los procedimientos para la consecución de las muestras biológicas se realizaron salvaguardando la integridad y dignidad de los sujetos.

La participación en este estudio no implicó ningún costo económico para los pacientes elegidos ni sus familiares y se utilizaron 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.

RESULTADOS

La muestra total del estudio comprendió 110 sujetos, 79 (71.8%) de ellos con sospecha clínica de FMRR, y 31 (28.2%) pacientes con síndrome febril agudo, pero sin sospecha de FMRR. Los sujetos del primer grupo incluyeron 72 muestras de orina y 7 de hisopado cutáneo; las muestras del grupo de comparación fueron sangre (31) y orina (18).

Cuando examinamos diferencias en características sociodemográficas y clínicas de los grupos de estudio, se apreció que la edad media (20.9 ± 15.2) del grupo control fue mayor ($p=0.002$) que la de los pacientes con FMRR. También se observó una diferencia significativa (<0.001) en los días de evolución desde el comienzo de los síntomas, con los pacientes de hisopado mostrando el mayor lapso de tiempo (7.28 ± 1.97), seguido por los sujetos a los que se tomó muestra de orina (6.16 ± 3.32). Adicionalmente, se encontró una diferencia significativa ($p=0.009$) en la cuenta plaquetaria ($\times 10^3$), con los pacientes de hisopado cutáneo teniendo los valores más bajos (41.25 ± 30.55), seguidos por los sujetos a los que se tomó muestra de orina (94.54 ± 90.00). No se apreciaron otras diferencias significativas en las variables examinadas (Tabla III).

Por otra parte, cuando se examinaron diferencias de los sujetos con muestras de orina, se observó que 23 (31.9%) fueron positivas, que todas ellas provenían de pacientes hospitalizados y 7 (30.4%) de ellos fallecieron, lo que fue estadísticamente diferente ($p=0.009$) de los pacientes con resultado negativo, en quienes murieron 3

Tabla III. Características seleccionadas de pacientes con sospecha de FMRR por tipo de muestra.

Variable	Pacientes con orina N (%) [n=72]	Pacientes con Hisopado N (%) [n=7]	Pacientes Gpo comparación N (%) [n=31]	p ^{1/}
Edad (Media \pm DS) ^{&}	11.79 \pm 10.34	13.11 \pm 7.07	20.90 \pm 15.19	0.002*
Defunciones	10 (13.8)	2 (28.57)	0 (0.0)	0.301
Muestras positivas	23 (31.94)	3 (42.85)	0 (0.0)	0.557
Días de evolución (media + DS) ^{A/}	6.16 \pm 3.32	7.28 \pm 1.97	3.77 \pm 2.21	<0.001*
Tipo de paciente [#]				
- Hospitalario	70 (97.22)	7 (100.0)	27 (87.09)	
- Ambulatorio	2 (2.78)	0 (0.0)	4 (12.91)	0.065
Datos clínicos y de laboratorio [#]				
- Fiebre	72 (100.0)	7 (100.0)	31 (100.0)	1.000
- Cefalea	65 (90.27)	7 (100.0)	29 (93.54)	0.720
- Exantema	55 (76.38)	5 (71.42)	18 (58.06)	0.096
- Malestar General	57 (79.16)	6 (85.71)	26 (83.87)	0.565
- Leucocitos [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (media \pm DS) ^{&}	9.42 \pm 5.54	10.12 \pm 5.71	8.44 \pm 7.61	0.092
- Plaquetas [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (media \pm DS) ^{&}	94.54 \pm 90.00	41.25 \pm 30.55	137.42 \pm 75.58	0.009 *
Tipo de la localidad de residencia [#]				
- Rural	16 (22.23)	3 (42.86)	12 (38.70)	
- Urbana	56 (77.77)	4 (57.14)	19 (61.29)	0.076

[&] Basado en una prueba de ANOVA; [#]Basado en una prueba chi cuadrada; * Estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95%

A/ Días de evolución desde el comienzo de los síntomas hasta la toma de la muestra

(6.1%) sujetos. La otra diferencia significativa ($p=0.007$) se encontró en el recuento plaquetario (por 10^3), con los pacientes con muestra positiva mostrando un promedio de 58.82 ± 56.17 , inferior al del grupo negativo (111.3 ± 98.17). No hubo diferencias significativas en cuanto a la distribución por sexo, pero 17 (75.0%) muestras fueron tomadas a niños menores de 15 años de edad [datos no mostrados]; otras características examinadas no mostraron diferencias significativas (Tabla IV).

Por lo que respecta a las características de los pacientes a los que se les tomó hisopado, no se apreciaron diferencias significativas tal como se detalla en la tabla V. No obstante, es importante señalar que dos de los tres hisopados positivos provenían de menores de edad, a los que se tomó muestras de lesiones de una pierna, otra se tomó de un brazo y una más fue tomada de la lesión de un pie (Figura 2).

En las muestras de orina se identificaron 21 muestras positivas a *Rickettsia rickettsii* y 2 positivas a *Rickettsia* spp, de las 72 procesadas; el coeficiente de confiabilidad (K) fue de 0.615, con un IC95% (0.386, 0.8436). Por lo que respecta a los hisopados cutáneos, se identificaron 3 positivos a *Rickettsia rickettsii* de las 7 muestras procesadas; el coeficiente de confiabilidad (K) fue de 0.417, aunque sin significancia estadística, pues el IC95% fue (-0.338, 1.172), como se aprecia en la tabla VI.

Por otra parte, se apreció una diferencia significativa ($p<0.001$) en la distribución de la época del año en que se tomó la muestra. Consistente con la época de mayor incidencia de casos, el trimestre agosto-octubre fue el más prolífico en muestras, pues concentró 52.7% ($n=38$) de ellas. Adicionalmente, septiembre fue el mes con mayor proporción (50.0%) de muestras positivas, mientras en agosto aun cuando se procesaron 10 muestras, sólo 20% resultaron positivas, los detalles se despliegan en la figura 3. También se observó diferencia significativa ($p<0.001$) en la distribución proporcional de las muestras por grupo de edad, con el grupo de sujetos menores de 18 años aportando 77.5% de las muestras; en este mismo grupo, los niños menores de 5 años mostraron el mayor porcentaje (40.0%) de positividad, tal como se aprecia en la figura 4.

Tabla IV. Características seleccionadas de pacientes con sospecha de FMRR con orinas positivas o negativas.

Variable	Pacientes con Orinas positivas N (%) [n=23]	Pacientes con Orinas negativas N (%) [n=49]	P1/
Edad (media \pm DS)	11.87 \pm 10.08	11.73 \pm 10.56	0.818
Defunciones	7 (30.43)	3 (6.12)	0.009*
Días de evolución (media \pm DS) ^{A/}	6.86 \pm 2.77	5.71 \pm 3.37	0.159
Tipo de paciente #			
- Hospitalario	23 (100.0)	47 (95.91)	
- Ambulatorio	0 (0.0)	2 (4.08)	0.325
Datos clínicos y de laboratorio #			
- Fiebre	23 (100.0)	49 (100.0)	1.000
- Cefalea	20 (86.95)	43 (87.75)	1.000
- Exantema	20 (86.95)	34 (69.38)	0.147
- Malestar General	18 (78.26)	38 (77.55)	1.000
- Leucocitos [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (media \pm DS) ^{&}	10.63 \pm 5.60	8.97 \pm 5.60	0.193
- Plaquetas [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (media \pm DS) ^{&}	58.82 \pm 56.17	111.3 \pm 98.17	0.007*
Tipo de la localidad de residencia #			
- Rural	7 (30.43)	9 (18.36)	
- Urbana	16 (69.56)	40 (81.63)	0.361

& Basado en una prueba U de Mann-Whitney; #Basado en una prueba chi cuadrada; * Estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95%; A/ Días de evolución desde el comienzo de los síntomas hasta la toma de la muestra

Tabla V. Características seleccionadas de pacientes con sospecha de FMRR con hisopado positivo o negativo.

Variable	Pacientes con Hisopados positivos N (%) [n=3]	Pacientes con Hisopados negativos N (%) [n=4]	p1/
Edad (media \pm DS)	12.56 \pm 7.5	19.22 \pm 14.44	0.472
Defunciones	0 (0.0)	2 (50.0)	0.428
Días de evolución (media \pm DS) ^{A/}	6.66 \pm 2.88	7.75 \pm 1.25	0.573
Tipo de paciente #			
- Hospitalario	3 (100.0)	4 (100.0)	1.000
- Ambulatorio	0 (0.0)	0 (0.0)	0.277
Datos clínicos y de laboratorio #			
- Fiebre	3 (100.0)	4 (100.0)	1.000
- Cefalea	3 (100.0)	4 (100.0)	1.000
- Exantema	2 (66.66)	4 (100.0)	0.428
- Malestar General	3 (100.0)	4 (100.0)	1.000
- Leucocitos [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (media \pm DS) ^{&}	6.9 \pm 4.43	12.04 \pm 5.90	0.143
- Plaquetas [$\times 10^3/\mu\text{l}$] (media \pm DS) ^{&}	46.66 \pm 34.42	38.00 \pm 31.71	0.571
Tipo de la localidad de residencia #			
- Rural	2 (66.66)	1 (25.0)	
- Urbana	1 (33.33)	3 (75.0)	0.485

& Basado en una prueba U de Mann-Whitney; #Basado en una prueba chi cuadrada; * Estadísticamente significativo a un nivel de

confianza del 95%; A/ Días de evolución desde el comienzo de los síntomas hasta la toma de la muestra



Figura 2. Lesión tipo escara provocada por la mordedura de la garrapata en un paciente con FMRR.

Tabla VI. Coeficiente de Kappa e intervalo de confianza calculado para orina e hisopado.

		Sangre Total		Coeficiente Kappa	IC 95%*
		Positivo	Negativo		
Orina	Positivo	23	0	0.615	(0.385, 0.844)
	Negativo	14	35		
Hisopado	Positivo	2	1	0.417	(-0.338, 1.172)
	Negativo	1	3		

* Intervalo de confianza al 95% para el coeficiente de Kappa

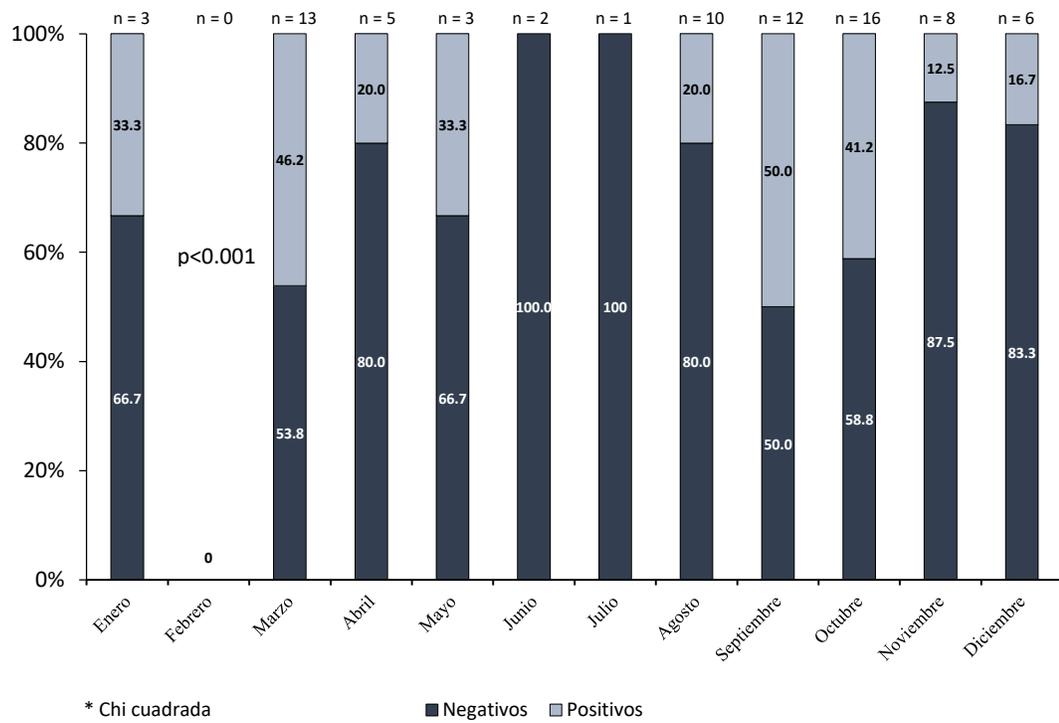


Figura 3. Muestras de pacientes con sospecha de FMRR según mes de la toma y resultado.

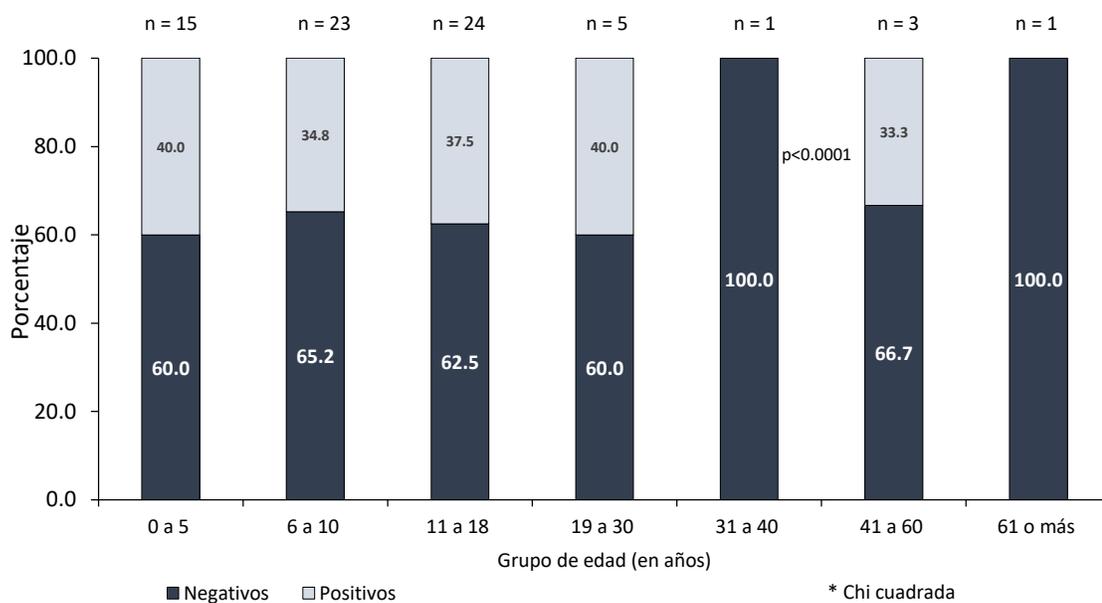


Figura 4. Porcentaje de positividad de pacientes con sospecha de FMRR según grupo de edad.

También se apreció una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), en los días de evolución clínica en los que se tomó la muestra; en tal contexto, se observó positividad a partir del 4° día de iniciados los síntomas, con el mayor porcentaje (70.0%) de positivos en los sujetos a los que se tomó muestra el día 6 y en el 7° día (66.7%), aunque fue en el 5° día de evolución cuando se tomó el mayor volumen de muestras ($n=19$; 23.8%), aun cuando sólo obtuvo 31.6% de positividad (Figura 5).

Por otra parte, un dato importante es que, aunque el mayor porcentaje (75%) de muestreo ocurrió en el turno laboral matutino (07:00 – 14:00 horas), la frecuencia de positividad (80%) fue mayor en las muestras tomadas en el turno vespertino (14:01 – 21:00 horas), las diferencias observadas fueron significativas ($p = 0.0396$), (Figura 6).

El tratamiento antibiótico suministrado a los pacientes con sospecha de FMRR fue doxiciclina, se tiene registro que 66 pacientes (82.5%) recibieron dicho tratamiento. De ellos, 20 pacientes (30.3%) recibieron el tratamiento con retraso, es decir, después de los 5 días de iniciados los síntomas, aunque en ellos se observó 40% de positividad. Cuarenta y seis (69.7%) pacientes recibieron el tratamiento oportunamente (antes del 5° día de evolución), con un porcentaje de positividad de 26.1%, no obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.382$), (Figura 7).

Las muestras fueron tomadas en 10 distintos hospitales públicos de Sonora, por motivos de confidencialidad se les asignó una letra (de la A a la J), aunque es importante señalar que el hospital con mayor muestreo correspondió a un hospital pediátrico (A), con 71.3%, seguido por un hospital general en el sur del estado (B) con 15%, quien también resultó con el mayor porcentaje de positividad (58.3%) ($p = 0.034$), (Figura 8).

Aun cuando no fue propósito del estudio caracterizar a las muestras por el sitio de residencia de los sujetos con sospecha de FMRR, se analizaron muestras procedentes de 18 municipios del estado (Figura 9), con la mayor proporción ($n=40$; 55.6%) correspondiendo a Hermosillo, seguido por Cajeme y Guaymas ($n=5$; 6.9% cada uno). El resto se despliega en el mapa de la figura 9.

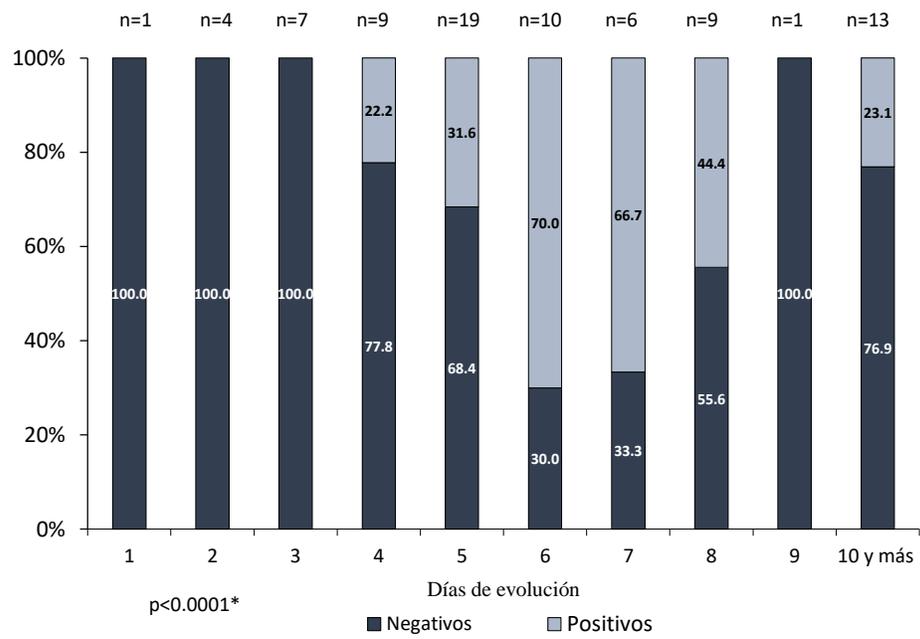


Figura 5. Porcentaje de positividad de pacientes con sospecha de FMRR según días de evolución.

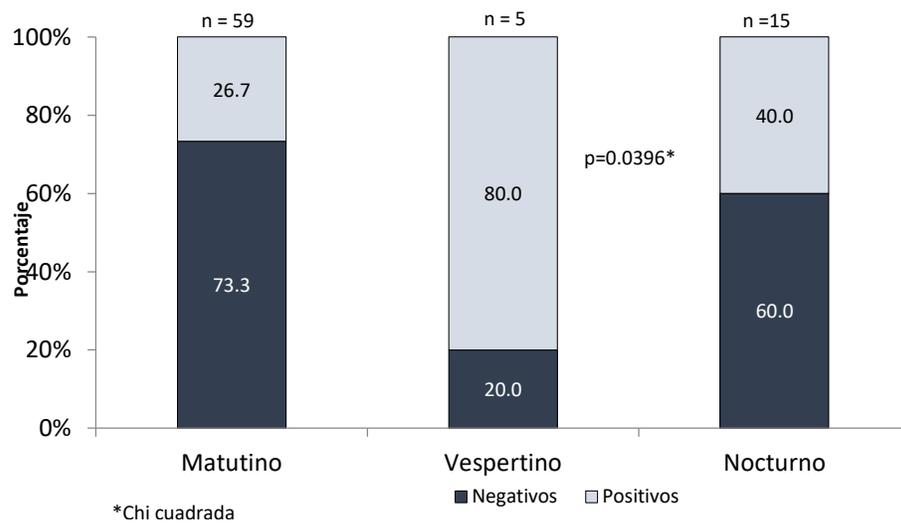


Figura 6. Porcentaje de positividad de muestras de pacientes con sospecha de FMRR según turno laboral de muestreo.

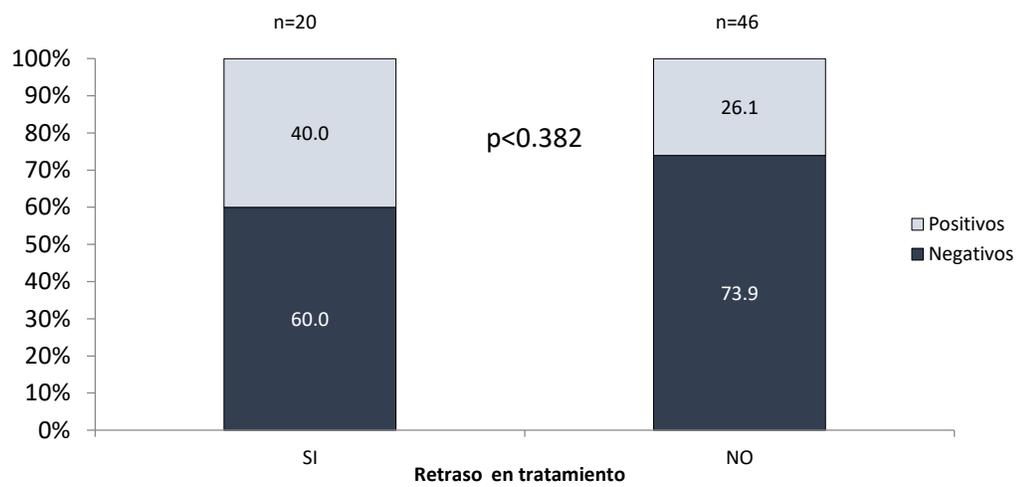


Figura 7. Porcentaje de positividad de muestras de pacientes con sospecha de FMRR tomadas con y sin retraso en el tratamiento antibiótico.

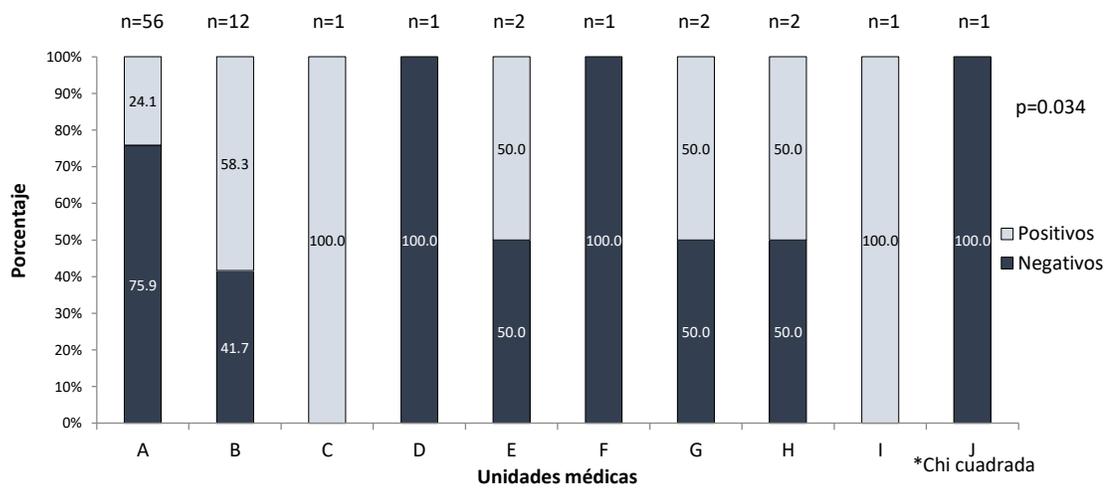


Figura 8. Porcentaje de positividad de muestras de pacientes con sospecha de FMRR tomadas en distintas unidades médicas.

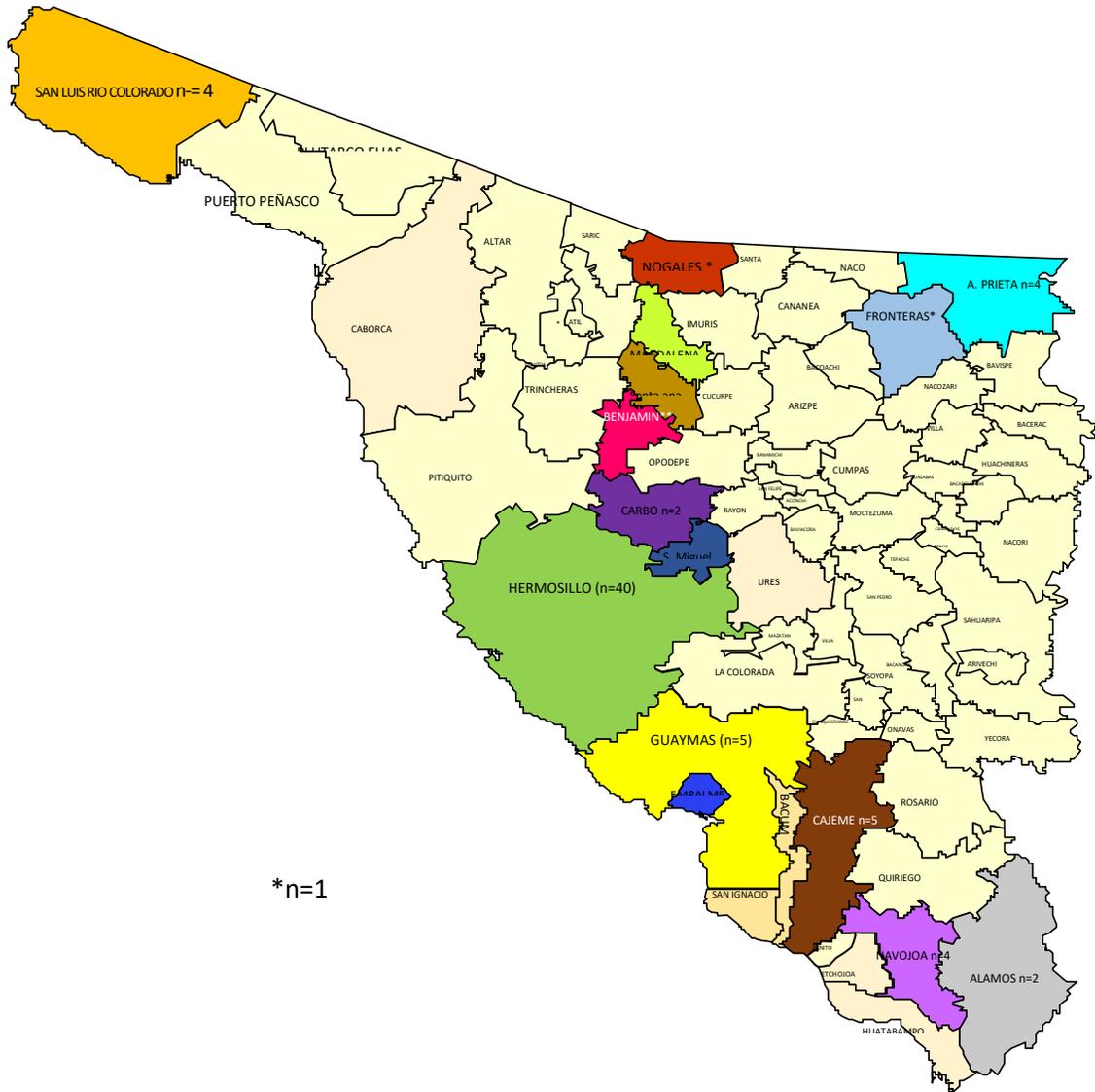


Figura 9. Municipios de Sonora donde se recolectaron muestras de orina e hisopado cutáneo.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la técnica de PCR tiene una buena confiabilidad para el diagnóstico de FMRR en muestras de orina procedentes de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad, cuando se les compara con PCR en punto final realizado en muestras de sangre total. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio mexicano que examina la confiabilidad de PCR en muestras de orina para confirmar la infección por *R. rickettsii*; el hallazgo puede contribuir positivamente a incrementar el inventario de herramientas diagnósticas para detectar la presencia de la bacteria, que como es aceptado, es difícil identificar por la técnica estándar, que es la detección de seroconversión de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI), que requiere que transcurran al menos 7 días para tomar la primera muestra y esperar hasta la tercera semana para confirmar la elevación en los títulos de anticuerpos específicos (Oteo y col., 2014; Biggs y col., 2016).

Como se sabe, el manejo clínico de la FMRR no debe sustentarse en la confirmación diagnóstica por alguna prueba de laboratorio, y aunque la evidencia reciente señala lo promisorio que resultan los métodos de biología molecular (Oteo y col., 2014; Kato y col., 2013), aún su utilidad en muestras clínicas poblacionales, ha sido escasamente evaluada. Por tal motivo, que este estudio haya encontrado que PCR tiene una buena confiabilidad en muestras de orina puede ser relevante, especialmente porque se identificaron resultados positivos en pacientes con sospecha clínica de la enfermedad que cursaban su 4° día de evolución clínica, aunque entre los días seis (70.0%) y siete (66.7%), se observaron mayores proporciones de positividad. No obstante, aún es un desafío encontrar una prueba rápida con validez y confiabilidad adecuadas, que confirme el diagnóstico en los primeros 3 días de evolución clínica de la enfermedad. Sin concluir en este sentido, el desempeño de PCR en las muestras de orina puede ser considerado mejor que el de IFI, el estándar de oro, para el que usualmente se requieren 4 semanas para un diagnóstico confirmatorio (Secretaría de Salud, 2017). La positividad que observamos en las muestras de orina, fue más elevada en el sexto día, lo

que podría deberse a que el riñón empieza a eliminar la bacteria en esa fase de la infección, y ocurre con frecuencia en pacientes con cuadros severos del padecimiento.

Por otra parte, no fue posible documentar que el esquema de PCR sea confiable en muestras de hisopado cutáneo, lo que pudo asociarse al escaso número de pacientes con sospecha de FMRR que presentaron escaras, lo que limitó considerablemente la obtención de muestras. Por este motivo, no podemos afirmar que la muestra de hisopado cutáneo sea una opción primaria para el diagnóstico de FMRR en población similar a la del presente estudio, pero tampoco podemos descartar su utilidad clínica, ya que como se observó en este estudio, se detectó *R. rickettsii* en 3 hisopados cutáneos, de tal manera que cuando un paciente con sospecha de FMRR presente una escara y no sea posible tomar muestra sanguínea por trombocitopenia severa o daño del tejido endotelial, el hisopado cutáneo sería una alternativa diagnóstica. Aunque no podemos concluir, un hallazgo que llama la atención es que, en un paciente con resultado negativo en su muestra sanguínea, tras 3 días de tratamiento con doxiciclina, fue positivo en hisopado cutáneo. Nuestros hallazgos, aunque no son concluyentes, si son consistentes con otros estudios, en los que también han podido identificar a la bacteria en este tipo de muestra (Bechah y col., 2011). Especialmente a partir del sexto día de evolución, como fue en nuestro estudio, lo que puede asociarse a una mayor concentración de bacterias en la lesión o escara (Bouatra y col., 2013; Bechah y col., 2011).

En este contexto del hisopado cutáneo, es conveniente señalar que las células endoteliales son las células blanco principales durante una infección sistémica por *Rickettsia rickettsii*, lo que resalta el valor del muestreo del sitio de inoculación. Nuestro hallazgo enfatiza el valor de tomar muestras del sitio de inoculación en la piel para el diagnóstico de la enfermedad en la fase aguda, como se observó en los estudios de hisopados de escaras tomados de pacientes con *R. parkeri* y otras infecciones por rickettsias del grupo de fiebres manchadas (Biggs y col., 2016). La infección también induce infiltración inflamatoria en otros órganos infectados durante el curso de la enfermedad (Saito y col., 2019). En nuestro estudio se apreció que las lesiones de donde se tomó la muestra de hisopado cutáneo se encontraban mayormente en las

extremidades, lo que es consistente con reportes previos, que mencionan que las áreas del cuerpo donde mayormente se pueden encontrar garrapatas adheridas son la cabeza, ingle, pierna, pie, brazo, abdomen. (Biggs y col., 2016).

Por lo que se pudo observar, la mordedura de la garrapata *R. sanguineus sensu lato* no produce con frecuencia la característica escara que ha sido documentada en mordeduras de garrapatas de otras especies, entre ellas, *Dermacentor variabilis* en la parte oriental de EE.UU. y *Dermacentor andersoni* en los estados de las montañas rocosas, o en infecciones por otras rickettsias como *R. conori* (Tomassone y col., 2018); el muestreo del hisopado cutáneo en tales regiones podría constituir una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad (Biggs y col., 2016).

Por otra parte, y contrario a recomendaciones convencionales para tomar la muestra para el diagnóstico de FMRR, que sugieren que el mejor momento es por la mañana, de preferencia la primera orina del día o la toma sanguínea en ayunas, y algunos estudios demuestran que hay mayor carga de ADN de la bacteria en muestreos matutinos de sangre (Kato y col., 2016), los resultados de nuestro estudio muestran que fue más frecuente obtener resultados positivos cuando la muestra fue tomada en el turno laboral vespertino (14:01-21:00 hrs), nuevos estudios deben realizarse a nivel regional para concluir en este sentido.

La FMRR es altamente estacional, su incidencia es más alta en condiciones de aumento de temperatura y humedad ambientales, que en otras regiones diferentes a Sonora ocurre a final de primavera y el verano (Chen y col., 2008); en nuestro estudio se obtuvo mayor muestreo (21.3%) en el mes de octubre y mayor positividad (50.0%) en el mes de septiembre, que es la época de mayor humedad relativa y temperatura ambiental, lo que favorece la reproducción y actividad de *Rhipicephalus sanguineus* y por lo tanto mayor transmisión de la bacteria (Dantas, 2008).

Un aspecto importante que merece sea considerado cuidadosamente en futuras evaluaciones de la confiabilidad de PCR para confirmar infección por *R. rickettsii*, es el antecedente de administración de antibiótico. En nuestro estudio, a la mayoría de los pacientes se les suministró oportunamente y fue más alto el número de casos negativos

obtenidos para este grupo, lo que es esperado y clínicamente deseable. En los pacientes que presentaron retraso (más de 5 días de evolución) en el tratamiento antibiótico se observó mayor positividad, debido a que es más probable detectar la bacteria cuando aún no ha sido disminuida o eliminada su carga por la acción del antibiótico en cualquier tipo de muestra (Biggs y col., 2016).

Finalmente, una variedad de ensayos basados en PCR se utilizan ampliamente para la detección de ADN rickettsial en tejidos y muestras de sangre, la mayoría en ensayos de laboratorio. Sin embargo, los ensayos moleculares no son infalibles, pues dependen de diversos factores, como la calidad del ADN extraído y en consecuencia, los resultados de la PCR se ven afectados. La presencia de varios inhibidores de la PCR, la elección de la diana genética para la amplificación, el rendimiento de los iniciadores y el grado de optimización del ensayo también afectan significativamente la sensibilidad y la fiabilidad de los ensayos moleculares. El progreso en el desarrollo de ensayos de PCR en tiempo real abre nuevas perspectivas para mejorar el rendimiento diagnóstico de los métodos moleculares, particularmente en lo que respecta a su sensibilidad. Ésta técnica podría reducir el tiempo de diagnóstico en orina e hisopado cutáneo a 4 días o menos (Zemtsova y col., 2015).

CONCLUSIONES

1. El esquema de PCR en muestras de orina tiene una buena confiabilidad para confirmar el diagnóstico de FMRR, cuando se le compara con PCR en punto final en muestras sanguíneas. Este hallazgo puede ser clínicamente relevante, pues se encontraron resultados positivos en sujetos desde su 4º día de evolución de la enfermedad. Considerando que es confiable, PCR en muestras de orina es una alternativa útil cuando no sea posible tomar una muestra sanguínea en pacientes clínicamente compatibles con la sospecha de la enfermedad.
2. No fue posible evidenciar la confiabilidad del esquema de PCR utilizado en muestras de hisopado cutáneo, lo que no necesariamente implica que carezca de utilidad clínica, pues aunque no se encontró significancia estadística en el coeficiente de Kappa, probablemente debido a que un escaso número de pacientes desarrolló una escara o lesión de continuidad para tomar muestra, sí se obtuvieron resultados positivos en sujetos con sospecha de la enfermedad.
3. Nuestro estudio puede contribuir positivamente a fortalecer la capacidad y oportunidad diagnóstica de los Servicios de Salud, así como en la calidad diagnóstica de los médicos y de forma indirecta, en el control epidemiológico de FMRR en la región. También puede representar una línea basal para continuar la investigación en México, con muestras no invasivas para el diagnóstico de FMRR.

Recomendaciones

1. Estandarizar un esquema de PCR en tiempo real para el diagnóstico de *R. rickettsii* en muestras de orina e hisopado cutáneo y de esta manera reducir aún más el tiempo de respuesta en el diagnóstico (menos de 4 días).
2. Implementar capacitación sobre fiebre manchada en niveles básicos de educación, para poder crear conciencia sobre este padecimiento desde edades tempranas.
3. Realizar estudios con mayor número de muestras de hisopado cutáneo para poder determinar con firmeza su confiabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro, D., & Medina, B. (2008). Epidemiología de las Rickettsiosis, Una Revisión Narrativa. Aportes para la Vigilancia Epidemiológica. *U. de Antioquia*, 1–88.
- Alvarez-Hernandez, G., Murillo-Benitez, C., Del Carmen Candia-Plata, M., & Moro, M. (2015). Clinical profile and predictors of fatal rocky mountain spotted fever in children from Sonora, Mexico. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 34(2), 125–130. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000496>
- Álvarez-Hernández G, González-Roldán JF, Hernández-Milán NS, Lash RR, Barton-Behravesh C, Paddock CD. (2017). Rocky Mountain spotted Fever in Mexico: past, present and future. *Lancet Infectious Diseases* 17 (6): e189-e196.
- Argüello, A. P., Hun, L., Rivera, P., & Taylor, L. (2012). Case report: A fatal urban case of Rocky Mountain spotted fever presenting an eschar in San José, Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(2), 345–348. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0153>
- Bal, A. E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R. A., De Meza-Brewster, J., Korver, H., & Terpstra, W. J. (1994). Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1894–1898.
- Bechah, Y., Socolovschi, C., & Raoult, D. (2011). Identification of rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 83–86. <https://doi.org/10.3201/eid1701.100854>
- Bernabeu-Wittel, M., & Segura-Porta, F. (2005). Enfermedades producidas por Rickettsia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(3), 163–172. <https://doi.org/10.1157/13072167>
- Biggs, H. M., Behravesh, C. B., Bradley, K. K., Dahlgren, F. S., Drexler, N. A., Dumler, J. S., ... Traeger, M. S. (2016). Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report*.

- Recommendations and Reports*, 65(2), 1–44.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., ... Wishart, D. S. (2013). The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, 8(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R. J., Bjoërsdorff, A., Blanco, J. R., ... Wilske, B. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x>
- Cerda Lorca, J., & Villarroel Del P., L. (2008). Evaluaci??n de la concordancia inter-observador en investigaci??n pedi??trica: Coeficiente de Kappa. *Revista Chilena de Pediatría*, 79(1), 54–58.
- Chen, L. F., & Sexton, D. J. (2008). What ' s New in Rocky Mountain Spotted Fever ?, 22, 415–432. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.008>
- Clifton, D. R., Rydkina, E., Huyck, H., Pryhuber, G., Freeman, R. S., Silverman, D. J., & Sahni, S. K. (2005). Expression and secretion of chemotactic cytokines IL-8 and MCP-1 by human endothelial cells after Rickettsia rickettsii infection: Regulation by nuclear transcription factor NF-κB. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(4), 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.05.006>
- Combata, A. L., Gheit, T., Gonzalez, P., Puerto, D., Murillo, R. H., Montoya, L., ... Wiesner, C. (2016). Comparison between Urine and Cervical Samples for HPV DNA detection and typing in young women in Colombia. *Cancer Prevention Research*, 9(9), 766–771. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0038>
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- De Lara Huerta, J., & Cárdenas Barragán, R. (2008). Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en pediatría. Revisión clínica de una serie de 115 casos. *Revista de Enfermedades Infecciosas En Pediatría*, XXII(Fiebre manchada), 4–9.

- Eremeeva, M. E., Zambrano, M. L., Anaya, L., Beati, L., Karpathy, S. E., Santos-Silva, M. M., ... Aranda, C. A. (2011). *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 48(2), 418–421. <https://doi.org/10.1603/ME10181>
- Estripeaut, D., Aramburú, M. G., Sáez-Llorens, X., Thompson, H. A., Dasch, G. A., Paddock, C. D., ... Eremeeva, M. E. (2007). Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerging Infectious Diseases*, 13(11), 1763–1765. <https://doi.org/10.3201/eid1311.070931>
- Gomes, C. M., Cesetti, M. V., De Paula, N. A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R. N. R., & Roselino, A. M. (2017). Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 526–534. <https://doi.org/10.1128/JCM.01954-16>
- Gopinath, K., & Singh, S. (2009). Urine as an adjunct specimen for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(3), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.07.022>
- Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>
- Hernández, G. A., & Soto, J. J. C. (2013). Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de sonora, 2004-2012. *Salud Publica de Mexico*, 55(2), 151–152. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342013000200004>
- Instituto, & Epidemiológicos, de D. y R. Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de las Rickettsiosis (2017).
- Kato, C., Chung, I., & Paddock, C. (2016). Estimation of *Rickettsia rickettsii* copy number in the blood of patients with Rocky Mountain spotted fever suggests cyclic diurnal trends in bacteraemia Appendix A . Supplementary data Acknowledgement

- References. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4), 394–396.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.019>
- Kato, C. Y., Chung, I. H., Robinson, L. K., Austin, A. L., Dasch, G. A., & Massunga, R. F. (2013). Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 314–417. <https://doi.org/10.1128/JCM.01723-12>
- La Scola, B., & Raoult, D. (1997). Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. [https://doi.org/0095-1137/97/\\$04.00?0](https://doi.org/0095-1137/97/$04.00?0)
- Labruna, M. B., Ph, D., V, S. M., Ph, D., Nava, S., Ph, D., ... Ph, D. (2011). Rickettsioses in Latin America , Caribbean , Spain and Portugal. *Rev. MVZ Cordoba*, 16(2), 2435–2457.
- Labruna, M. B., Whitworth, T., Horta, M. C., Bouyer, D. H., McBride, J. W., Pinter, A., ... Walker, D. H. (2004). *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 90–98. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). Kappa-type An Application of Hierarchical among Agreement of Majority in the Assessment Statistics Multiple Observers, 33(2), 363–374.
- Minichová, L., Hamšíková, Z., Mahríková, L., Slovák, M., Kocianová, E., Kazimírová, M., ... Špitalská, E. (2017). Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. *Parasites & Vectors*, 10(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2094-8>
- Muñoz, L., & Casanueva, M. E. (2002). Garrapatas (Acari: Ixodidae) en perros de la ciudad de Concepción, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(1), 131–134. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000100015>
- Oteo, J. A., Nava, S., Sousa, R. de, Mattar, S., Venzal, J. M., Abarca, K., ... Zavala-Castro, J. (2014). Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las

- rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 54–65. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100009>
- Rozental, T., Eremeeva, M. E., Paddock, C. D., Zaki, S. R., Dasch, G. A., & Lemos, E. R. S. (2006). Fatal case of Brazilian spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1078, pp. 257–259). <https://doi.org/10.1196/annals.1374.046>
- Saah AJ, 2.GL, M., & Bennett JE. (1997). Rickettsiosis. *Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica, 4ª edición*, 1924–1949.
- Saito, T. B., Bechelli, J., Smalley, C., Karim, S., & Walker, D. H. (2019). Vector Tick Transmission Model of Spotted Fever Rickettsiosis. *American Journal of Pathology*, 189(1). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.09.005>
- Salinas Casado, J. (2008). El estudio de la orina. Luis Cifuentes Delatte en el paso del arte a la ciencia. *Archivos Españoles de Urología*, 61(10), 1197–1202. <https://doi.org/10.4321/S0004-06142008001000003>
- Sexton, D. J., Kanj, S. S., Wilson, K., Corey, G. R., Hegarty, B. C., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (1994). The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(1), 59–63.
- Sonora, S. de S. Cierre Anual del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector (2011).
- Tomassone, L., Portillo, A., Nováková, M., De Sousa, R., & Oteo, J. A. (2018). Neglected aspects of tick-borne rickettsioses. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2856-y>
- Walker, D. H., Paddock, C. D., & Dumler, J. S. (2008). Emerging and Re-emerging Tick-Transmitted Rickettsial and Ehrlichial Infections. *Medical Clinics of North America*, 92(6), 1345–1361. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.06.002>
- Zavala-Castro, J. E., Dzul-Rosado, K. R., León, J. J. A., Walker, D. H., & Zavala-Velázquez, J. E. (2008). An increase in human cases of spotted fever rickettsiosis in

Yucatan, Mexico, involving children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 907–910.

Zavala-velázquez, J. E., Ruiz-sosa, J. a, Sánchez-elias, R. a, & Becerra-carmona, G. (2000). Rickettsia felis rickettsiosis in Yucatán For personal use only . Not to be reproduced without permission of The Lancet . Chronic neuropathic pain in treated leprosy For personal use only . Not to be reproduced without permission of The Lancet ., 356, 1079–1080.

Zemtsova, G. E., Montgomery, M., & Levin, M. L. (2015). Relative sensitivity of conventional and real-time PCR assays for detection of SFG Rickettsia in blood and tissue samples from laboratory animals. *PLoS ONE*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116658>.

APÉNDICES

Apéndice I

Estudio Epidemiológico de Caso de Enfermedades Transmitidas por Vector

SAIUD		IMSS		ISSSTE		SEDENA		SEMAR		PEMEX		DIF		CDI	
SISTEMA NACIONAL DE SALUD															
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE CASO DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR															
I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE.															
No. de afiliación o expediente: _____ Folio de Caso: _____															
Nombre: _____				RFC: _____				CURP: _____							
Apellido paterno				Apellido materno				Nombres							
DATOS DEL NACIMIENTO															
Fecha de nacimiento: _____				Estado de nacimiento: _____				Jurisdicción de nacimiento: _____							
Municipio de nacimiento: _____				Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>				Edad: Años _____ Meses _____ Días _____							
RESENCIA ACTUAL															
Domicilio: _____															
Localidad: _____				Calle y No. _____				Municipio: _____				Ciudad: _____			
Estado: _____				Teléfono (s) _____											
Calle: _____				y calle: _____								C.P. _____			
LUGAR LABORAL															
Domicilio: _____															
Localidad: _____				Calle y No. _____				Municipio: _____				Estado: _____			
Teléfono (s) _____															
Si lo donde pasa mayor parte del tiempo: Trabajo <input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Escuela <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> Especifique: _____															
¿Habla lenguas indígenas? SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconoce <input type="checkbox"/> ¿Cuál? _____ ¿En indígenas? SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Ignorado: <input type="checkbox"/>															
II. DATOS DE LA UNIDAD NOTIFICANTE															
CLAVE DE LA UNIDAD: _____				Estado: _____				Jurisdicción: _____							
Municipio: _____				Localidad: _____				Inscripción: _____							
Delegación: _____															
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: _____															
III. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS															
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: _____				Ciudad/Municipio: _____							
País: _____				Estado/Provincia: _____				Ciudad/Municipio: _____							
CONTACTO CON ANIMALES:															
MOSCO <input type="checkbox"/>				CHIBICHE <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"/>															
ANTECEDENTES DE MUERTES INUSUALES DE ANIMALES:															
GURDIO <input type="checkbox"/>				AVE <input type="checkbox"/>				OTRO <input type="checkbox"/>							
IV. CUADRO CLÍNICO (SI - 1, No - 2, Ignorados - 9)															
Fecha de inicio de signos y síntomas: _____															
Fiebre <input type="checkbox"/>				Fecha de inicio de la fiebre: _____				Temperatura: _____ °C							
Cefalea <input type="checkbox"/>				Escalofríos <input type="checkbox"/>				Alteraciones del gusto <input type="checkbox"/>				Estupor <input type="checkbox"/>			
Mialgias <input type="checkbox"/>				Fotofobia <input type="checkbox"/>				Adenomegalias <input type="checkbox"/>				Desorientación <input type="checkbox"/>			
Artralgias leves o moderadas <input type="checkbox"/>				Dolor abdominal intenso <input type="checkbox"/>				Infección <input type="checkbox"/>				Tosbor <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"/>				Diseña <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"/>				Médulas <input type="checkbox"/>				Otitis <input type="checkbox"/>			
Conjuntivas <input type="checkbox"/>				Faringitis <input type="checkbox"/>				Ulceras <input type="checkbox"/>				Otros <input type="checkbox"/>			
Prurito <input type="checkbox"/>				Rinitis <input type="checkbox"/>				Lesión de membranas mucosas <input type="checkbox"/>							
Vozillo persistente <input type="checkbox"/>				Hepatoesplenomegalia <input type="checkbox"/>				Edema <input type="checkbox"/>							
Mucosas <input type="checkbox"/>				Espironeumalgia <input type="checkbox"/>				Rigidez de cuello <input type="checkbox"/>							
* Incapacitantes															
ESCAPE DE LIQUIDOS															
Fecha de inicio de signos y síntomas: _____															
Pellejones <input type="checkbox"/>				Ascitis <input type="checkbox"/>				HEMORRÁGIAS <input type="checkbox"/>							
Equimosis <input type="checkbox"/>				Derrame pleural <input type="checkbox"/>				Egiprorragia <input type="checkbox"/>				Otros: _____			
Hematomas <input type="checkbox"/>				Edema <input type="checkbox"/>				Epistaxis <input type="checkbox"/>							
Trombocitopenia <input type="checkbox"/>				Piel necrosada <input type="checkbox"/>				Hematemesis <input type="checkbox"/>							
URIN: _____								Micturia <input type="checkbox"/>							
FUE HOSPITALIZADO: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>															
FECHAS: INGRESO: _____				MANEJO AMBULATORIO: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>											
NOMBRE DE LA UNIDAD TRATANTE:															
Clave de la Unidad: _____				Inscripción: _____				Servicio de atención: _____							
¿Acudió a unidad de primer nivel? SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>				Número de veces que acudió: _____				Urgencias médicas <input type="checkbox"/>				Terapia Intensiva <input type="checkbox"/>			
								Medicina Interna <input type="checkbox"/>				Gineco-Obstetricia <input type="checkbox"/>			
								Pediatría <input type="checkbox"/>				Otras, especifique: _____			
								Terapia Intensiva <input type="checkbox"/>							
Diagnóstico inicial hospitalario: Fiebre por Dengue: <input type="checkbox"/> Fiebre Hemorrágica por Dengue: <input type="checkbox"/> Estado del paciente: Cravo <input type="checkbox"/> No grave <input type="checkbox"/>															
Otro <input type="checkbox"/>															
COMORBILIDAD															
Embarazo <input type="checkbox"/>				Trastornos hemorrágicos: <input type="checkbox"/>				Diabetes: <input type="checkbox"/>				Hipertensión: <input type="checkbox"/>			
Hemoglobinopatías <input type="checkbox"/>				Cirrosis hepática: <input type="checkbox"/>				Otros: <input type="checkbox"/>				Enf. ulcero péptica: <input type="checkbox"/>			
												Enf. Renal <input type="checkbox"/>			
												Especifique: _____			

Apéndice II

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: Estimación de la Confiabilidad de un Esquema de PCR para Detectar Infección por *Rickettsia rickettsii* en Muestras de Hisopado Cutáneo y Orina

Investigador Principal: Dr. Gerardo Álvarez Hernández/ Q.B. Cynthia Yadira García Cortez

Localidades donde se realizará el estudio: Hermosillo

Nombre del participante: _____

A usted o su familiar se le está invitando a participar en este estudio, debido a que es posible que haya estado o esté en contacto con garrapatas infectadas por una bacteria llamada *Rickettsia rickettsii* que se transmite por la mordedura de garrapatas del perro. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como *Consentimiento Informado*. Siéntase en absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si voluntariamente desea participar, entonces le pediremos que firme esta Hoja de Consentimiento Informado.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR) es una enfermedad que puede ser mortal, pero es tratable y prevenible, y ocurre en el estado de Sonora desde hace poco más de una década. Su mortalidad está ligada a la falta de sospecha diagnóstica temprana y al inicio tardío del tratamiento antibiótico específico; además tiene un diagnóstico tardío por el laboratorio. La PCR es un método útil para confirmar el diagnóstico en muestras de sangre tomada durante los primeros días de la enfermedad, sin embargo, es necesario saber si otras muestras obtenidas mediante métodos menos complicados como el hisopado cutáneo (raspado indoloro con hisopo suave) y la orina, son útiles para diagnosticar la enfermedad. En México, el uso de este tipo de muestra no ha sido evaluado para dicho diagnóstico.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Recolectar muestras de hisopado cutáneo y orina de pacientes de hospitales públicos de Hermosillo con sospecha de FMRR (o “Rickettsia”) para estimar si es confiable la PCR para detectar si la *Rickettsia* infectó a una persona y le provocó síntomas de la fiebre manchada.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Este proyecto tiene un beneficio que puede ser utilizado para mejorar las condiciones de salud de la población que fue mordida por una garrapata; no simplifica ni duplica investigación previa realizada en la región. La participación en este estudio no implicará ningún costo económico para los pacientes elegidos ni sus familiares y se garantizará 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.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

A usted o su familiar enfermo, le pediremos que nos permita tomar una muestra única de sangre (en un tubo de 3 mL), así como una muestra de la primera orina del día y en caso de presentar alguna lesión cutánea, se le tomará muestra con un hisopo, mediante un raspado no doloroso.

Le tomaremos una muestra de orina (20 a 30 mL aproximadamente), por parte de personal especializado del hospital donde es atendido, tomando las medidas apropiadas para evitar que la toma de la muestra represente alguna molestia adicional. En caso de que haya condiciones para obtener el hisopado cutáneo, se le hará un raspado con hisopo estéril de material suave como el dacrón, en la escara, vesículas o contenido de lesiones maculopapulares, el hisopo se colocará en un tubo estéril de plástico y con tapa.

Además, en caso de aceptar participar en el estudio, le pediremos datos generales como edad, escolaridad, lugar donde reside y tiempo de residir en la localidad. El cuestionario no contendrá su nombre y únicamente será identificado por un folio para la captura de datos. El tiempo estimado para su llenado es de 10 a 15 minutos. No obstante que Usted aceptara participar, tiene la libertad de retirarse en el momento en que usted lo decida, sin que ello represente ninguna condición que afecte el derecho que tiene a su atención.

RIESGOS/INCOMODIDADES QUE PUEDE EXPERIMENTAR POR SU PARTICIPACIÓN

Es posible que al tomar la muestra sanguínea se puede presentar un ligero dolor o molestia con la punción venosa (piquete), también es probable la aparición de un pequeño hematoma. Es poco probable pero puede aparecer sangrado al momento de la punción. Si algo de eso ocurriera, el personal médico del hospital hará lo necesario para solucionar la incomodidad. En la toma del hisopado puede haber dolor si se tiene piel sensible, sobre todo si existe una costra y ésta se desprende de la lesión. En el caso de alguna de estas molestias, será atendido convenientemente por el personal de salud del hospital, sin que esto represente un costo adicional a su atención.

COMPENSACIÓN

No se entregará compensación si usted acepta participar en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN

Los datos proporcionados por usted a través del cuestionario y todos los procedimientos del estudio, serán almacenados en la más estricta confidencialidad, y sólo serán identificados por una *clave numérica* y resguardados bajo llave en el Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora. Los datos que nos proporcione, no podrán utilizarse en análisis futuros, sin haber obtenido previamente su consentimiento. Tampoco se utilizarán ni serán proporcionados a terceras personas con fines diferentes a los especificados. Nunca perderán su carácter de confidencialidad. La prueba física (cuestionario) que nos proporcione, será almacenada por 3 años a partir de la recolección y después destruidos.

PROBLEMAS O PREGUNTAS

Usted tiene el derecho a preguntar sobre cualquier aspecto del estudio, así como a retirarse de esta investigación en cualquier momento, si así lo desea. Para cualquier duda o pregunta que usted tenga, puede comunicarse a los siguientes teléfonos:

Investigador	Teléfono oficina	Teléfono celular
Investigador responsable: Dr. Gerardo Álvarez Hernández	2 59 21 21	66 21 12 60 80
Investigadora: Q.B. Cynthia Yadira García Cortez	259 21 21	66 22 04 46 83

Por medio de esta *forma de consentimiento* declaro que se me han explicado claramente los objetivos y procedimientos de esta investigación, así como los beneficios de mi participación, por lo que voluntariamente acepto participar en el estudio Estimación de la Confiabilidad de un Esquema de PCR para Detectar Infección por *Rickettsia rickettsii* en Muestras de Hisopado Cutáneo y Orina.

Nombre y firma

Apéndice III

ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO: Estimación de la Confiabilidad de un Esquema de PCR para Detectar Infección por *Rickettsia rickettsii* en Muestras de Hisopado Cutáneo y Orina

Investigador Principal: Dr. Gerardo Álvarez Hernández/ Q.B. Cynthia Yadira García Cortez

Localidades donde se realizará el estudio: Hermosillo

Nombre del participante: _____

Estás invitado a participar en este estudio, debido a que es posible que tus malestares se deban a una bacteria llamada *Rickettsia rickettsii* que es transmitida por la mordedura de la garrapata del perro; queremos mejorar tu salud y que te sientas mejor. Por eso te pediremos una muestra de sangre, orina y si presentas una herida, la frotaremos con un hisopo. No corres ningún peligro y en el caso de la muestra de sangre, sólo sentirás un pequeño piquete. Tus papás están enterados de esta invitación y están de acuerdo en lo que te pedimos. Los médicos y enfermeras estarán cuidando de que no te sientas mal.



¿Deseas participar en este estudio? SI NO

Apéndice IV

Cálculos de coeficiente de kappa e intervalo de confianza para orinas e hisopados

Orina	Sangre total		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	23	0	23
Negativo	14	35	49
Total	37	35	72

Cálculos para coeficiente de kappa:

$$K = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

$$\text{Pr}(a) = \frac{23+35(\text{concordantes en total})}{72 (\text{total muestras})} = 0.8055$$

$$\text{pr}(A) \times \text{pr}(B) = \left(\frac{23}{72}\right) \times \left(\frac{37}{72}\right) = 0.3194 \times 0.5138 = 0.1641 \text{ positivos}$$

$$\text{pr}(A) \times \text{pr}(B) = \left(\frac{49}{72}\right) \times \left(\frac{35}{72}\right) = 0.6805 \times 0.4861 = 0.3308 \text{ negativos}$$

$$\text{pr}(e) = 0.1641 + 0.3308 = \mathbf{0.4949}$$

$$K = \frac{(0.8055 - 0.4949)}{(1 - 0.4949)} = \frac{0.3106}{0.5051} = \mathbf{0.615}$$

Cálculos intervalo de confianza para el coeficiente de kappa:

$$IC_k = K \pm 1.96 (\sigma_k) \quad \sigma_k = \sqrt{[\text{Pr}(e) / N (1 - \text{Pr}(e))]}$$

$$\sigma_k = \sqrt{[0.4949 / 72 (1 - 0.4949)]} = \sqrt{(0.4949) / 36.3672} = \sqrt{0.01361} \quad \sigma_k = \mathbf{0.1167}$$

$$IC_k = K \pm 1.96 (0.1167) = K \pm 0.2286$$

$$IC_k = 0.615 + 0.2286 = 0.8436$$

$$IC_k = 0.615 - 0.2286 = 0.3864 \quad IC_k(0.384, 0.8436)$$

Hisopado	Sangre total		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	2 (A)	1 (B)	3
Negativo	1 (C)	3 (D)	4
Total	3	4	7

Cálculos para coeficiente de kappa:

$$\text{Pr}(a) = 5(\text{concordantes en total})/7 (\text{total muestras}) = 0.7142$$

$$\text{pr}(A) \times \text{pr}(B) = (3/7) \times (3/7) = 0.4285 \times 0.4285 = 0.1836 \text{ positivos}$$

$$\text{pr}(A) \times \text{pr}(B) = (4/7) \times (4/7) = 0.5714 \times 0.5714 = 0.3265 \text{ negativos}$$

$$\text{pr}(e) = 0.1836 + 0.3265 = \mathbf{0.5101}$$

$$K = (0.7142 - 0.5101) / (1 - 0.5101) = 0.2041 / 0.4899 = \mathbf{0.417}$$

Cálculos intervalo de confianza para el coeficiente de kappa:

$$IC_k = K \pm 1.96 (\sigma_k) \quad \sigma_k = \sqrt{[\text{Pr}(e) / N (1 - \text{Pr}(e))]}$$

$$\sigma_k = \sqrt{[0.5101 / 7 (1 - 0.5101)]} = \sqrt{(0.5101) / 3.4293} = \sqrt{0.1487} \quad \sigma_k = \mathbf{0.3856}$$

$$IC_k = K \pm 1.96 (0.3856) = K \pm 0.7759$$

$$IC_k = 0.417 + 0.7759 = 1.172$$

$$IC_k = 0.417 - 0.7759 = -0.338 \quad IC_k (-0.338, 1.172)$$

Apéndice V

Preparación de Reactivos

- **Deoxinucleótidos 2.5 mM:** En un microtubo de 0.5 mL estéril, colocar 5 μ L de cada deoxinucleótido (100 mM) y agregar 180 μ L de agua deionizada estéril.
- **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 μ M. Diluir 1:5, por ejemplo 80 μ L de agua + 20 μ L de primer, para obtener una concentración final de 20 μ M.
CS-F (5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3)
CS-R (5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3)
RRI-F (5'-AAATCAACGGAAGAGCAAAAC-3)
RRI-R (5'-CCCTCCACTACCTGCATCAT-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.
- **TBE 5X (Tris, Ácido bórico y EDTA), pH 8.0:**
 - Disolver 54 gramos de tris base en 800 mL de agua destilada
 - Agregar 27.5 gramos de ácido bórico
 - Agregar 20 mL de EDTA 0.5 M
 - Ajustar el pH a 8.0 utilizando HCl
 - Aforar a 1000 mL
 - Esterilizar en autoclave
- **Buffer de corrida PFGE (TBE 1 X):** Diluir 130 mL de buffer TBE 5X en 520 mL de agua deionizada.
- **GELSTAR®:** Diluir 1:10 el reactivo comercial GELSTAR®, con agua deionizada estéril.