

Confiabilidad del hisopado de piel y muestra de orina para detectar fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en Sonora usando PCR en punto final en pacientes hospitalizados

Cutaneous Swab and Urine Samples Reliability to Detect *Rickettsia rickettsii* through PCR in hospitalized patients, Sonora

Cynthia Yadira García-Cortez¹, Gerardo Álvarez Hernández^{1*}, Enrique Bolado Martínez², Maria del Carmen Candia Plata¹, Miguel Ángel Martínez Medina³

¹ Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

² Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro. CP 83000. Hermosillo, Sonora, México.

³ Área de Enseñanza e Investigación, Hospital Infantil del Estado de Sonora. Calle Reforma 355. Colonia Ley 57. CP. 83100. Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

La determinación de anticuerpos IgM e IgG por inmunofluorescencia indirecta es la prueba estándar para confirmar la fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR), aunque tiene limitado valor clínico pues requiere tres semanas para ser confiable. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una opción para el diagnóstico en sangre total, pero hay menos certidumbre respecto a su capacidad al usar muestras de orina y tejido. Nos proponemos estimar la confiabilidad de PCR en muestras de hisopado cutáneo y orina en pacientes sospechosos de FMRR, comparándole con resultados de PCR en muestras de sangre total. Se analizaron muestras de 110 pacientes sospechosos de FMRR atendidos en hospitales de Sonora, entre septiembre de 2018 y octubre de 2019. El cálculo de la confiabilidad se realizó mediante el Coeficiente de Kappa (K). Se detectó *R. rickettsii* en 21 muestras de orina, encontrando una concordancia sustancial (K = 0.607, IC 95 % (0.385, 0.844)); en tanto, 3 hisopados cutáneos resultaron positivos, pero sin significancia estadística (K = 0.417, IC95 % (- 0.338, 1.172)). Nuestros hallazgos sustentan que la PCR en orina es una técnica confiable para confirmar la sospecha clínica de FMRR en pacientes hospitalizados.

Palabras clave: Fiebre manchada de las Montañas Rocosas, PCR, detección temprana de la enfermedad, confiabilidad.

ABSTRACT

Rocky Mountain spotted fever (RMSF) is an infectious disease confirmed through IgM and IgG determination obtained by indirect immunofluorescence, although it has limited clinical value since it requires up to three weeks to be reliable. Polymerase Chain Reaction (PCR) is an alternative for RMSF diagnosis in whole blood, but there is less certainty regarding its certainty when urine and tissue samples are used. This study aimed to estimate the reliability of PCR in skin swab and urine samples obtained from patients with suspected RMSF, comparing it with PCR results from whole blood samples. Samples from 110 suspected RMSF hospitalized patients, between September 2018 and October 2019, were analyzed. Reliability was calculated using the Kappa

Coefficient (K). *R. rickettsii* was detected in 21 urine samples, finding substantial agreement (K = 0.607, 95 % CI (0.385, 0.844)); meanwhile, 3 skin swabs were positive, but without statistical significance (K = 0.417, 95 % CI (- 0.338, 1.172)). Our findings support that urine PCR is a reliable technique to confirm clinical suspicion of RMSF in hospitalized patients. **Key words:** Rocky Mountain spotted fever, PCR, early detection of disease, reliability.

INTRODUCCIÓN

La fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* (FMRR) es una enfermedad reemergente en Sonora. Es un padecimiento transmitido al humano por artrópodos vectores infectados, en México la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* es el principal vector de la enfermedad (Eremeeva *et al.*, 2015). La FMRR constituye una amenaza médica cuando no es tratada oportunamente al asociarse a una elevada letalidad, que oscila en Sonora entre 20 y 40 % (Álvarez *et al.*, 2015). Históricamente, en la región su presencia está ligada a determinantes biológicos y sociales, que explican la ocurrencia de casos y brotes durante todo el año (Álvarez y Contreras, 2013).

La sospecha temprana de FMRR se complica por la poca especificidad del cuadro clínico inicial, que semeja a otros padecimientos endémicos de la región como dengue e influenza (Álvarez *et al.*, 2017). La confirmación diagnóstica puede establecerse hasta cuatro semanas posteriores al inicio sintomático al identificar una cuadruplicación en los títulos de anticuerpos IgM e IgG por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (La Scola y Raoult, 1997; Biggs *et al.*, 2016). La IFI es la prueba estándar para confirmar FMRR, pero es menos útil clínicamente, pues cuando los títulos de IgM e IgG son evidencia confirmatoria el paciente se ha recuperado o ha fallecido.

Una técnica alternativa para confirmar FMRR es la reacción en cadena de polimerasa (PCR), pues es un método válido y más temprano para confirmar la sospecha en muestras de sangre total (Bechah *et al.*, 2011; Santibáñez *et al.*, 2013; Oteo *et al.*, 2014). Sin embargo, es menos claro su desempeño en otras muestras biológicas como el hisopado

cutáneo y orina, que además de ser menos invasivas, sean oportunas para la toma de decisiones médicas de esta enfermedad, como ha sido documentado en otros padecimientos con similar expresión clínica como fiebre Zika (Gourinat *et al.*, 2015), leptospirosis (Bal *et al.*, 1994) y tuberculosis (Gopinath y Singh, 2009).

La presente investigación explora la confiabilidad clínica del hisopado cutáneo y la orina obtenidos de pacientes sospechosos de FMRR que fueron atendidos en hospitales públicos de Sonora, mediante la técnica de PCR en punto final. El estudio pretende generar resultados que mejoren la capacidad diagnóstica de la FMRR a nivel regional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante un diseño transversal se estimó la confiabilidad de muestras de hisopado cutáneo y de orina de pacientes hospitalizados por sospecha clínica de FMRR, utilizando la PCR en punto final para identificar *Rickettsia rickettsii*. Los pacientes fueron atendidos en hospitales públicos de Sonora entre el 20 de septiembre de 2018 y el 31 de octubre de 2019. Para examinar la capacidad diagnóstica de PCR en ambas muestras, se empleó como método estándar la determinación de PCR en muestras sanguíneas obtenidas de los mismos pacientes. El estudio recibió aprobación por parte de un comité de ética en investigación acreditado.

Tipo y tamaño de la muestra

La muestra del estudio constó de 110 sujetos que recibieron atención médica en los sitios de estudio; de ellos, 79 (71.8 %) fueron sospechosos de FMRR (Grupo I), y fueron comparados con 31 (28.2 %) pacientes con cuadro febril infeccioso agudo de al menos de 5 días de evolución, pero sin sospecha del diagnóstico de interés (Grupo II). Para ser elegibles, los pacientes de ambos grupos firmaron una hoja de consentimiento informado o de asentimiento en el caso de menores de edad.

Los procedimientos para obtener las muestras biológicas fueron: para hisopado cutáneo, la lesión maculopapular, vesícula o escara fue humedecida con una gasa embebida en solución salina estéril, y un hisopo de dacrón o rayón estéril se giró vigorosamente, entre cinco y seis veces en un ángulo de 50° a 60°, en la base de la lesión y se retiró la costra cuando fue posible, sin lastimar al paciente; posteriormente el hisopo se colocó en tubo estéril de plástico con solución salina estéril y con tapa (InDRE- Lineamientos Rickettsiosis, 2017). La muestra de orina se tomó directamente del chorro urinario (20 a 30 mL), en un contenedor estéril etiquetado para su identificación. La orina colectada fue examinada durante las primeras 24 h, tal como es recomendado (Salinas, 2008).

Procesamiento de las muestras

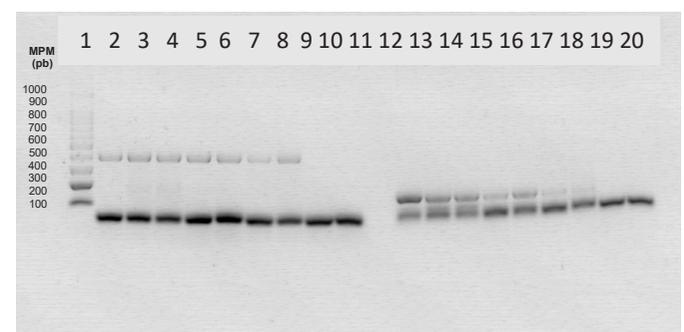
Se utilizó el equipo automatizado Magna Pure Compact LC 2.0 de Roche® para la extracción del ADN. Las muestras recibieron pretratamiento: la orina se centrifugó por 30 min a 4,000 rpm para tomar 200 µL del sedimento; se tomaron 200 µL de sangre y se incubó 30 min con 20 µL

de proteinasa K. Al final de la extracción de ácidos nucleicos se obtuvieron 200 (µL) de ADN eluido. La integridad del ADN fue examinada mediante la nitidez de las bandas de amplificación derivadas de la electroforesis.

Para confirmar el género *Rickettsia* se preparó mezcla de reacción para identificar el gen *gltA* y otra para determinar la especie *rickettsii*, identificando el gen de la proteína hipotética A1G_04230; se utilizó el termociclador Bio-Rad ICycler. Las mezclas contenían: iniciadores CS-1(F) (5'-GCA-AGTATCGGTGAGGATGTAAT-3) y CS-2(R) (5'-GCTTCCTTAAA-ATTCAATAATCAGGAT-3) (0.8 µM), diseñados para amplificar un fragmento de 401 pares de bases (pb) del gen citrato sintasa (*gltA*) para *Rickettsia* (Labruna *et al.*, 2004) y los iniciadores RRi1(F) (5'-AAATCAACGGAAGAGCAAAAC-3) y RRi2(R) (5'-CCCTCCACTACTGCATCAT-3) (0.8 µM), para un fragmento de 153 pb de la proteína A1G_04230 para *rickettsii* (Kato *et al.*, 2012); agregando en ambas reacciones, MgCl₂ (3 mM), oligonucleótidos (200 µM), buffer 5X, Taq ADN polimerasa (0.5 U) y 5 µL de ADN extraído de la muestra, para una reacción de 25 µL. Se utilizó control positivo (ADN de *Rickettsia rickettsii*), control negativo (ADN de paciente sin FMRR) y agua destilada estéril para el blanco de PCR (Kato *et al.*, 2013).

Las condiciones de termociclado para género fueron: 1 ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos a: 95 °C por 15 s, 52 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y un ciclo a 72 °C por 10 min (Labruna *et al.*, 2004). Las condiciones para especie fueron: 1 ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos a: 95 °C por 15 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 30 s y un ciclo a 72 °C por 10 min, conservando los productos a -20 °C (Kato *et al.*, 2013).

Se realizó electroforesis a los productos de amplificación 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 80 V por 60 min. Se utilizó marcador de 100 pares de bases (pb) (Promega, U.S.A.) (Figura 1).



Carril 1: Marcador de 100 pb; carril 2: control positivo a género gen *gltA* (401 pb); carril 3 y 4: muestra de sangre positiva a género; carril 5 y 6: muestra de orina positiva a género; carril 7 y 8: muestra de hisopado de piel positiva a género; carril 9: control negativo de PCR; carril 10: blanco de PCR; carril 11: sin muestra; carril 12: control positivo a especie gen de la proteína A1G_04230 (153 pb); carril 13 y 14: muestra de sangre positiva a especie; carril 15 y 16: muestra de orina positiva a especie; carril 17 y 18: muestra de hisopado de piel positiva a especie; carril 19: control negativo de PCR; carril 20: blanco de PCR. MPM: marcador de peso molecular.

Figura 1. Bandas de amplificación de los genes *gltA* y proteína A1G_04230. Figure 1. Amplification bands of the *gltA* and A1G_04230 protein genes.

Plan de análisis

Se obtuvieron frecuencias relativas de las variables clínicas y sociodemográficas de los sujetos de estudio, y fueron contrastadas de acuerdo con la muestra biológica que se obtuvo: 1) muestras de orina; 2) muestras de hisopado cutáneo; y 3) sujetos sin sospecha de FMRR. Para examinar las diferencias de las variables categóricas se utilizó la prueba de Chi-cuadrada para igualdad de proporciones; para las variables continuas se emplearon las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) o U de Mann-Whitney, de acuerdo con su distribución. En todos los casos, se probaron hipótesis de dos colas y valores de $p \leq 0.05$ fueron juzgados estadísticamente significativos.

Para estimar la confiabilidad clínica de los resultados de la técnica de PCR en punto final en muestras de hisopado cutáneo y de orina, se contrastaron con los obtenidos en muestras de sangre total de los mismos sujetos de estudio. Se consideró positivo un resultado de PCR cuando se apreció una banda con un número de pares de bases acorde para cada uno de los genes amplificados (Fig. 1). La confiabilidad de la PCR se estimó mediante el coeficiente de Kappa de Cohen (K) (Cohen, 1960; Cerda-Lorca *et al.*, 2008), de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

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 (Landis y Koch, 1977).

RESULTADOS

En total se analizaron 110 muestras biológicas, 79 (71.8 %) de pacientes sospechosos de FMRR, de éstas, 72 (65.5 %) fueron orinas y 7 (6.4 %) hisopados cutáneos; en el grupo de comparación hubo 31 muestras de sangre. Entre las variables analizadas, se observó que la edad media de los casos sospechosos de FMRR fue menor que la del grupo de comparación (20.9 ± 15.2) y esta diferencia fue significativa ($p = 0.002$).

Se observó que los pacientes con sospecha de FMRR tenían un mayor promedio de días transcurridos desde el comienzo de sus síntomas que los sujetos del grupo de comparación, en los pacientes a los que se les tomó muestra de orina, en promedio tenían 6.2 ± 3.3 d, mientras en los de hisopado cutáneo la media fue de 7.3 ± 2.0 . La media del grupo de comparación fue de 3.8 ± 2.2 , esta diferencia también fue significativa ($p < 0.001$). Otra variable significativamente diferente ($p = 0.009$) fue la cuenta plaquetaria ($\times 10^3$), con los pacientes de hisopado, mostrando los valores más bajos (41.25 ± 30.55) seguidos por los de muestra de orina (94.54 ± 90.00). Los detalles se muestran en la Tabla I.

Se observó que 23 de las 72 (31.9 %) muestras de orina analizadas tuvieron un resultado confirmatorio a infección por *rickettsia* y que 7 (30.4 %) de esos sujetos fallecieron, mientras 3 (6.1 %) murieron en el grupo de pacientes ($n = 49$)

Tabla I. Condiciones de pacientes sospechosos de FMRR por tipo de muestra.
Table I. Conditions of RRMF-suspected patients by sample type.

Condición	Pacientes con orina N (%) [n = 72]	Pacientes con Hisopado N (%) [n = 7]	Pacientes Gpo comparación N (%) [n = 31]	p ^{1/}
Muestras positivas	23 (31.94)	3 (42.85)	0 (0.0)	0.557
Edad (Media \pm DS) &	11.79 ± 10.34	13.11 ± 7.07	20.90 ± 15.19	0.002*
Defunciones	10 (13.8)	2 (28.57)	0 (0.0)	0.301
Días de evolución (media \pm DS) ^{A/}	6.16 ± 3.32	7.28 ± 1.97	3.77 ± 2.21	< 0.001*
Manejo del paciente ^f				
- Hospitalario	70 (97.22)	7 (100.0)	27 (87.09)	0.065
- Ambulatorio	2 (2.78)	0 (0.0)	4 (12.91)	
Cuadro Clínico ^g				
- Fiebre	72 (100.0)	7 (100.0)	31 (100.0)	1.000
- 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
- Cefalea	65 (90.27)	7 (100.0)	29 (93.54)	0.720
- Plaquetas [$\times 10^3 / \mu\text{L}$] (media \pm DS) ^{&}	94.54 ± 90.00	41.25 ± 30.55	137.42 ± 75.58	0.009*
- Leucocitos [$\times 10^3 / \mu\text{L}$] (media \pm DS) ^{&}	9.42 ± 5.54	10.12 ± 5.71	8.44 ± 7.61	0.092
Localidad de residencia ^h				
- Rural	16 (22.23)	3 (42.86)	12 (38.70)	0.076
- Urbana	56 (77.77)	4 (57.14)	19 (61.29)	

& 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

negativos a *R. rickettsii*, lo que fue estadísticamente diferente ($p = 0.009$). También se encontraron diferencias significativas ($p = 0.007$) en el conteo de plaquetas ($\times 10^3$), pues los sujetos positivos tuvieron un promedio inferior (58.82 ± 56.17) al compararlos con los pacientes con orina negativa (111.3 ± 98.17) (Tabla II). No se apreciaron diferencias significativas en las variables analizadas entre los pacientes del grupo de hisopado cutáneo.

Entre las 23 muestras de orina positivas, en 21 se confirmó infección por *R. rickettsii* y en otras dos se identificó al género *Rickettsia*, pero no a la especie. Al estimar el coeficiente de Kappa se alcanzó un valor de 0.615, con un IC 95 % (0.386, 0.8436). En cuanto a los 7 hisopados cutáneos analizados, en 3 (42.8 %) pacientes se confirmó infección por *R. rickettsii*; en este caso el coeficiente de Kappa fue de 0.417, aunque no tuvo significancia estadística.

Otra característica analizada fueron las diferencias en cuanto a la época del año en que la muestra fue obtenida, observándose que la mayor proporción ($n = 38$; 52.7 %) de muestras se alcanzó durante el trimestre agosto-octubre, el de mayor temperatura y humedad ambiental, esta diferencia fue significativa ($p < 0.001$); en este trimestre, el mayor porcentaje (50.0 %) de positividad ocurrió en septiembre (Figura 2). También apreciamos que la mayor proporción (77.5 %) de muestras correspondió a pacientes menores de 18 años, aunque la tasa de positividad (40.0 %) más elevada se encon-

tró en las muestras de niños menores de 5 años y los adultos jóvenes entre 19 y 30 años.

Finalmente, la mayor proporción de muestras positivas se apreció en los sujetos en quienes se tomó la muestra entre el sexto (70.0 %) y séptimo día (66.7 %) de evolución clínica, aunque el mayor volumen ($n = 19$; 23.8 %) de muestras fue tomado en el quinto día, detectando en este, una positividad de 31.6 %. No obstante, se detectó infección rickettsial en la muestra de un paciente con 4 d de evolución de los síntomas.

DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos sustentan que la prueba de PCR punto final en muestras de orina es una técnica confiable para confirmar la sospecha clínica de FMRR. Esto al compararse con el desempeño de la misma prueba en muestras de sangre total. También observamos que en orina es posible detectar la infección por *R. rickettsii* desde el 4° día de evolución clínica, un momento relativamente temprano de la enfermedad. La identificación de la bacteria en orina puede ser explicada por el daño renal que ocurre en pacientes con formas graves de FMRR que ameritan hospitalización, sea por la liberación sistémica de endotoxinas y la activación de la cascada inflamatoria o por la invasión directa de la bacteria al tejido renal (Stevens *et al.*, 2014; Kamath e Iyengar, 2017).

Es importante considerar la potencial ventaja de la muestra de orina sobre la muestra sanguínea para diagnosticar FMRR, pues se ha documentado que la sensibilidad de ensayos de PCR tradicionales en muestras de sangre total es del 80 % (Kato *et al.*, 2013). Es posible inferir que esta capacidad aumentaría a partir del sexto y séptimo días cuando el riñón tiene un mayor daño tisular (Bouatra *et al.*, 2013) y la etapa crítica de la enfermedad ha comenzado. Por ello, recomendamos nuevos estudios sobre el tópico, incrementando el tamaño de la muestra, considerando cuidadosamente los días de evolución clínica e integrando un control interno para incrementar la reproducibilidad y ensayar la técnica de PCR en tiempo real.

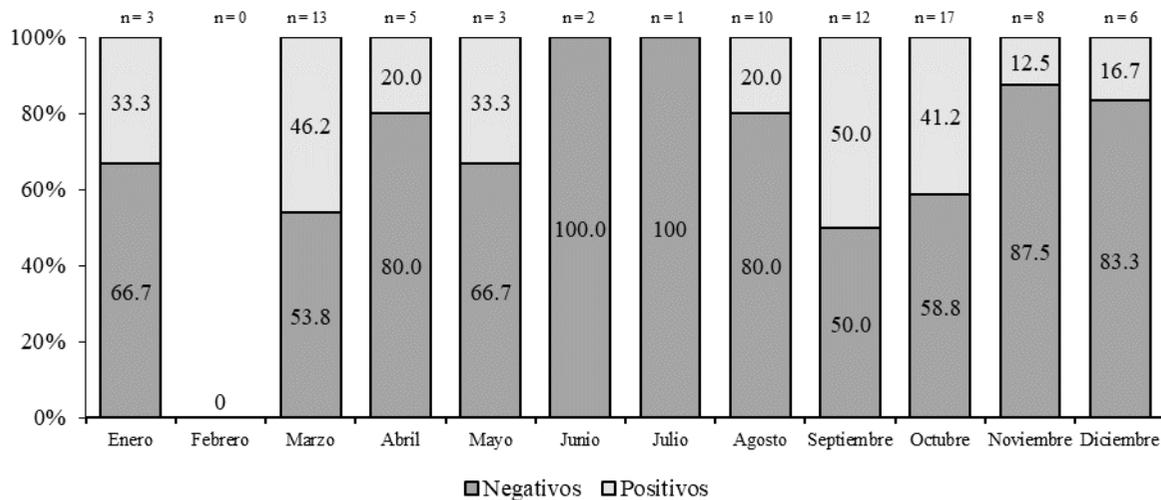
No tenemos antecedentes de estudios previos en México para evaluar la confiabilidad de PCR en muestras de orina para confirmar el diagnóstico de FMRR. Los hallazgos de esta investigación pueden ser utilizados como fundamento para incrementar la búsqueda de *R. rickettsii* en muestras de orina de pacientes con sospecha de FMRR. A la ventaja de que la recolección de la muestra de orina es menos invasiva y dolorosa que la de sangre total, debe considerarse que es superior en términos de oportunidad que la confirmación en muestras sanguíneas por IFI, que requiere que transcurran al menos tres semanas desde el comienzo de síntomas para detectar el incremento en los títulos de anticuerpos IgG (Oteo *et al.*, 2014; Biggs *et al.*, 2016). En el caso de Sonora, la mayor proporción de desenlaces fatales ocurre entre el séptimo y décimo (media 9.3 d) día de evolución (Álvarez *et al.*, 2021) por lo que sigue siendo una necesidad encontrar técnicas confiables para el diagnóstico de la enfermedad en su etapa inicial, pero PCR en muestras de orina parece ser una buena alternativa.

Tabla II. Condiciones de pacientes sospechosos de FMRR con muestra de orina positiva o negativa.

Table II. Conditions of RRMF-suspected patients with positive or negative sample.

Condición	Pacientes con Orinas positivas	Pacientes con Orinas negativas	P ^{1/}
	N (%) [n = 23]	N (%) [n = 49]	
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
Manejo del paciente [#]			
- Hospitalario	23 (100.0)	47 (95.91)	0.325
- Ambulatorio	0 (0.0)	2 (4.08)	
Cuadro Clínico [#]			
- Fiebre	23 (100.0)	49 (100.0)	1.000
- Exantema	20 (86.95)	34 (69.38)	0.147
- Malestar General	18 (78.26)	38 (77.55)	1.000
- Cefalea	20 (86.95)	43 (87.75)	1.000
- Plaquetas [$\times 10^3/\mu\text{L}$] (media \pm DS) [#]	58.82 \pm 56.17	111.3 \pm 98.17	0.007*
- Leucocitos [$\times 10^3/\mu\text{L}$] (media \pm DS) [#]	10.63 \pm 5.60	8.97 \pm 5.60	0.193
Localidad de residencia [#]			
- Rural	7 (30.43)	9 (18.36)	0.361
- Urbana	16 (69.56)	40 (81.63)	

& 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



$p < 0.0001^*$

Figura 2. Muestras de pacientes sospechosos de FMRR, según mes de la toma y resultado.

Figure 2. Samples from patients with suspected FMRR, according to the month of collection and result.

Respecto a la confiabilidad de PCR para confirmar FMRR en muestras de tejido obtenidas mediante hisopado cutáneo, se encontró que, aunque tiene una capacidad moderada de acuerdo con la escala propuesta por Landis (1977), no fue estadísticamente significativa, probablemente porque tuvimos un reducido número de pacientes que desarrollaron escaras, lo que limitó el poder estadístico de la muestra. A diferencia de otras rickettsiosis del grupo de fiebres manchadas, como en infecciones por *R. parkeri* o *R. massiliae*, la presencia de escaras, aunque posible en FMRR, es muy infrecuente (Walker *et al.*, 1981; Argüello *et al.*, 2012).

Por lo anterior, no tenemos evidencia que apoye la colecta rutinaria de tejidos mediante hisopado cutáneo para el diagnóstico de FMRR; sin embargo, en caso de identificarse una escara en pacientes con sospecha, alentamos a que se les tome hisopado cutáneo, pues como hemos documentado se identificó *R. rickettsii* en 3 hisopados cutáneos, uno de ellos en un paciente con resultado negativo en sangre, quien cursaba su tercer día de tratamiento con doxiciclina. No podemos descartar totalmente la potencial utilidad de PCR en este tipo de muestra biológica, pues ya otros investigadores (Bechah *et al.*, 2011) identificaron la bacteria utilizando esta técnica, especialmente en pacientes con más de seis días de evolución, cuando existe una mayor concentración de bacterias en la lesión o escara. En escenarios similares a Sonora, el hisopado de escaras puede contribuir a identificar otras especies de *Rickettsia* diferentes de *R. rickettsii*, como ha sido demostrado en otras regiones (Parola *et al.*, 2013).

Aunque no fue un objetivo del estudio, un hallazgo interesante es que fue más frecuente encontrar un resultado positivo en muestras tomadas entre las 14:00 y las 21:00 h, contrario a la recomendación de que el mejor momento para la toma de estas muestras sea por la mañana, cuando existe mayor carga de la bacteria (Kato *et al.*, 2016). No obstante, recomendamos que se lleven a cabo nuevos estudios regionales para concluir al respecto.

Se reconoce que la ocurrencia de FMRR es mayor cuando la temperatura y humedad ambientales se incrementan, favoreciendo el crecimiento, desarrollo, patrones de alimentación y multiplicación de las garrapatas *R. sanguineus* (Chen y Sexton, 2008; Parola *et al.*, 2018), esto es consistente con lo que observamos en nuestro estudio, pues la mayor proporción (21.3 %) de muestras sucedió en octubre y la mayor tasa de positividad (50.0 %) en septiembre, cuando la temperatura media es de 29 °C y el porcentaje de humedad relativa es superior al 30 % (CONAGUA, 2021), condiciones que se asocian a una mayor actividad alimentaria de la garrapata *R. sanguineus*, a incremento de transmisión e incluso, a la ocurrencia de formas más severas de rickettsiosis del grupo de fiebres manchadas (Dantas-Torres, 2008; Parola *et al.*, 2008). En este sentido, es recomendable efectuar en el corto plazo, investigaciones regionales para secuenciar los fragmentos de amplificación de DNA de *R. rickettsii* y correlacionarlos con la severidad de las manifestaciones clínicas.

Dada la poca especificidad de sus manifestaciones clínicas y la ventana de tiempo requerida, hasta 21 d, para confirmar mediante la prueba estándar, el diagnóstico de la FMRR permanece como un desafío. En este escenario, los ensayos moleculares de la PCR son la opción más promisoría para confirmar la sospecha diagnóstica de FMRR utilizando una variedad de muestras biológicas, incluyendo el hisopado cutáneo (Parola *et al.*, 2013). Una serie de factores, como la calidad del ADN extraído, la presencia de inhibidores de la PCR, la selección del blanco genético que se amplificará, el desempeño de los iniciadores y el grado de aprovechamiento del ensayo, pueden mermar la sensibilidad y la confiabilidad de la técnica. Por ello, se ha propuesto que el desarrollo de ensayos de PCR en tiempo real puede optimizar la capacidad diagnóstica de los métodos moleculares tradicionales, especialmente su sensibilidad, lo que tendría un impacto clínico muy favorable pues usando muestras de orina e hisopado

cutáneo, es posible disminuir a 4 d o menos el periodo para confirmar FMRR (Zemtsova *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Las muestras de orina analizadas mediante PCR en punto final mostraron una sustancial confiabilidad para detectar infección por *Rickettsia rickettsii* en pacientes con sospecha clínica de FMRR, cuando se le contrasta con PCR en muestras sanguíneas. Por ello, se plantea que la muestra de orina es una opción útil para confirmar el diagnóstico de FMRR en pacientes hospitalizados, y puede emplearse en pacientes con vasculitis severa o con daño endotelial sistémico como la trombocitopenia, en los que hay dificultad para tomar una muestra sanguínea.

Considerando que la presencia de escaras en FMRR es muy rara, el hisopado cutáneo no parece ser una alternativa que deba emplearse rutinariamente ante este tipo de pacientes. Pero si es una opción que debe considerarse en Sonora cuando se detecten pacientes con sospecha de alguna fiebre manchada acompañada por el desarrollo de escaras, pues es posible identificar la infección por alguna *Rickettsia* diferente a *R. rickettsii*, lo que es factible pues hay evidencia de *R. parkeri* en garrapatas de la región (Delgado-de la Mora *et al.*, 2019).

Nuestros hallazgos pueden representar una línea basal para futuras investigaciones regionales respecto a la capacidad diagnóstica de la PCR en muestras biológicas como la orina y tejido recolectado mediante hisopado cutáneo, lo que es necesario pues la FMRR en Sonora se mantiene como una región de alta endemia y una elevada letalidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por permitirnos el uso de sus laboratorios, equipos e instrumentos del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud. Gracias a los hospitales públicos de Sonora por el apoyo en la obtención de las muestras. Nuestra gratitud a miembros del Departamento de Zoonosis Rickettsiales de los Centros de Prevención y Control de los Estados Unidos (CDC, Atlanta) por su apoyo técnico en el desarrollo de este estudio.

REFERENCIAS

- Alvarez-Hernández G. y Soto-Contreras J.J. 2013. Letalidad por fiebre manchada por *Rickettsia rickettsii* en pacientes de un hospital pediátrico del estado de sonora, 2004-2012. Salud Publica de México. 55(2):151-152.
- Alvarez-Hernandez G., Murillo-Benitez C., Del Carmen Candia-Plata M. y 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.
- Álvarez-Hernández G., González-Roldán J.F., Hernández-Milán N.S., Lash R.R., Barton-Behravesh C. y Paddock C.D. 2017. Rocky Mountain spotted Fever in Mexico: past, present, and future. Lancet Infectious Diseases. 17 (6): e189-e196. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Alvarez-Lopez D.I., Ochoa-Mora E., Heitman K.N., Binder A.M., Álvarez-Hernández G. y Armstrong P.A. 2021. Epidemiology and clinical features of Rocky Mountain spotted fever from enhanced surveillance, Sonora, Mexico: 2015-2018. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 104 (1): 190-197.
- Argüello A.P., Hun L., Rivera P. y Taylor L. 2012. 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.
- Bal, A. E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R. A., De Meza-Brewster, J., Korver, H. y 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. y Raoult D. 2011. Identification of rickettsial infections by using cutaneous swab specimens and PCR. Emerging Infectious Diseases. 17(1):83-86
- Biggs H.M., Behravesh C.B., Bradley K.K., Dahlgren F.S., Drexler N.A., Dumler J.S., et al. 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 Reports Morbidity and Mortality Weekly Report [Internet]. 65(2):1-44.
- Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A.C., Wilson M.R., Knox C., et al. 2013. The Human Urine Metabolome. PLoS One. 8(9).
- Cerda Lorca J. y Villarroel Del P. L. 2008. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. Revista Chilena de Pediatría. 79(1):54.
- Chen L.F. y Sexton D.J. 2008. What's New in Rocky Mountain Spotted Fever ? Infectious Diseases Clinics of North America. 22:415-432.
- Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. Educational & Psychological Measurements. 20 (1): 37-46. doi:10.1177/001316446002000104
- Gobierno de México. Comisión Nacional del Agua. 2022. Resúmenes mensuales de temperatura y lluvia del Servicio Meteorológico Nacional. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>. Recurso en internet, consultado Junio 12, 2022
- Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Veterinary Parasitology. 152: 173-185.
- Delgado-de la Mora J., Sánchez-Montes S., Licona-Enríquez J.D., Delgado-de la Mora D., Paddock C.D., Beati L., et al. 2019. *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyoma maculatum* ticks, Mexico. Emerging Infectious Diseases; 25 (4): 836-38 DOI:10.3201/eid2504.181507
- Eremeeva M.E., Zambrano M.L., Anaya L., Beati L., Karpathy S.E., Santos-Silva M.M., et al. 2011. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. Journal of Medical Entomology. 48 (2): 418-421.
- Gopinath, K. y 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. y Dupont-Rouzeyrol, M. 2015. Detection of zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>

- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 2017. Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de las Rickettsiosis. 11-64.
- Kamath, N. y Iyengar, A. 2017. Infections and the kidney : a tale from the tropics. <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3785-2>
- 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.
- Kato C., Chung I., Paddock C.D. 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.
- Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., McBride J.W., Pinter A., et al. 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.
- Landis JR, Koch GG. 1977. No Title. *International Biometric Society*. 33:159-174.
- La Scola B. y Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2715-2727.
- Oteo J.A., Nava S., Sousa R. de, Mattar S., Venzal J.M., Abarca K., et al. 2014. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista Chilena de Infectología*. 31(1):54-65.
- Parola P., Socolovschi C., Jeanjean L., Bitam I., Fournier P.E. y Sotto A. 2008. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsiosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2 (11): e338 doi:10.1371/journal.pntd.0000338
- Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Meddianikov O., Kernif T., et al. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (4): 657-702.
- 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.
- Santibáñez S., Portillo A., Santibáñez P., Palomar A.M. y Oteo J.A. 2013. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsiosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 31 (5): 283-88.
- Stevens, J., Herberg, J. A. y Levin, M. 2014. *Infectious Diseases and the Kidney in Children*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27843-3>
- Walker D.H., Gay R.M. y Valdes-Dapena M. 1981. The occurrence of eschars in Rocky Mountain spotted fever. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 4:571-576.
- Zemtsova G.E., Montgomery M., y 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): e0116658