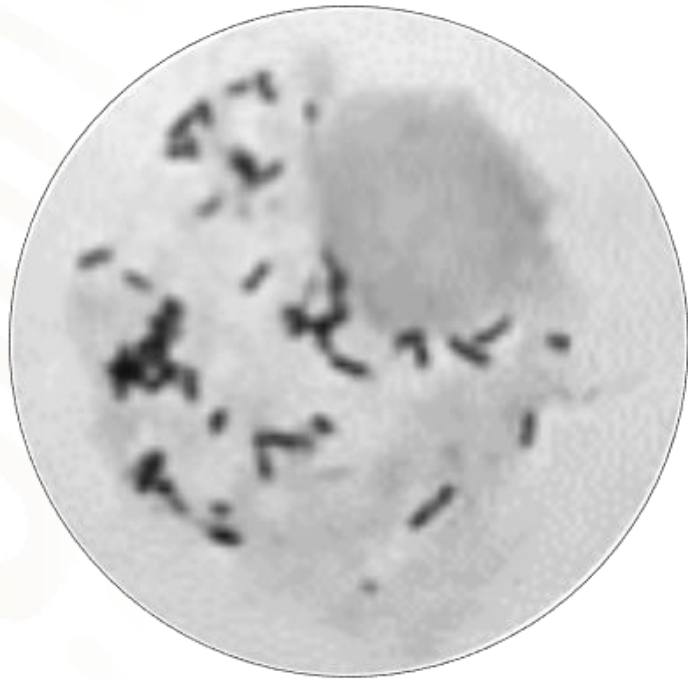




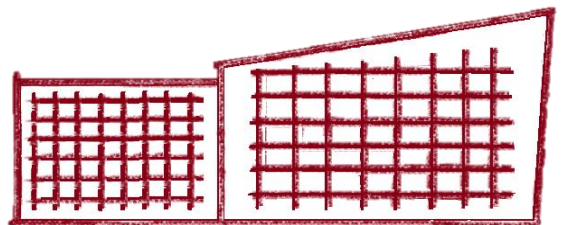
SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de las Rickettsiosis



InDRE



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LAS RICKETTSIOSIS

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2024

PRIMERA EDICIÓN DE 2024

RICKETTSIOSIS-INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CoNAVE)

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: "INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ". LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LAS RICKETTSIOSIS. INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2024"

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"
FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D. T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480,
CIUDAD DE MÉXICO.

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: M. EN C. CARINA BRITO LORAN

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA.

REVISIÓN DE CONTENIDO: M EN C RITA FLORES LEÓN

IMPRESO EN MÉXICO. *PRINTED IN MEXICO*

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS RICKETTSIOSIS A TRAVÉS DEL CORREO: CON EL ASUNTO: carina.brito@salud.gob.mx REVISIÓN DE LINEAMIENTOS

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dr. Ruy López Ridaura

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

Dr. Gabriel García Rodríguez

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS
“DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”
INDRE

Biól. Irma López Martínez

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

Mtra. Lucía Hernández Rivas

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

Lic. Julie Jeannette Ramírez Hernández

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

Dra. Herlinda García Lozano

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

M en C Imelda Eréndira Molina Gómez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

M en C Judith Estévez Ramírez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

GRUPO DE TRABAJO

M EN C. CARINA BERENICE BRITO LORÁN

JEFA DEL LABORATORIO DE LEPTOSPIROSIS Y RICKETTSIOSIS

COORDINADORA DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS RICKETTSIOSIS

QBP YUNUEN AGUILAR HERNÁNDEZ

QFB NAYELLI OTERO APARICIO

QFB ARIADNA BETSABE ARROYO VARGAS

QBP GUADALUPE ADRIANA GALICIA NICOLÁS

QBP MARÍA DOLORES TÉLLEZ SAUCEDO

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| ANTECEDENTES | 12 |
| MARCO LEGAL | 13 |
| DEFINICIONES OPERACIONALES | 15 |
| OBJETIVOS | 16 |
| RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS RICKETTSIOSIS | 17 |
| FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RNLSP | 18 |
| TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA | 22 |
| ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO | 27 |
| CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO | 28 |
| PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO | 30 |
| CRITERIOS PARA LA AUTORIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXÁMEN | 31 |
| BIBLIOGRAFÍA | 33 |
| ANEXOS | 35 |
| Anexo I: Bioseguridad | 35 |
| Anexo II: Técnica de inmunofluorescencia indirecta | 35 |
| Anexo III: Preparación de reactivos para la técnica de inmunofluorescencia indirecta | 43 |
| Anexo IV: Determinación de dilución óptima del conjugado mediante titulación para la técnica de inmunofluorescencia indirecta | 44 |
| Anexo V: Técnica de extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real | 47 |

INTRODUCCIÓN

Se conoce como rickettsiosis a un grupo de enfermedades causadas por bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Orientia*, las cuales presentan entre sí similitudes desde el punto de vista clínico y son transmitidas a través de vectores artrópodos hematófagos. En México estas enfermedades se presentan prácticamente en todo el país.

Las rickettsias son pequeños microorganismos intracelulares obligados, Gram negativos y con aspecto de bacilos cortos. Aunque pueden infectar varios tipos de células, incluyendo macrófagos y músculo liso vascular, los blancos primarios de infección en huéspedes mamíferos son las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos, causando vasculitis con infiltrado celular linfocítico. Se multiplican en el citosol y ocasionalmente en el núcleo de las células infectadas mediante fisión binaria en un período de 8 a 10 horas.

Las rickettsias son transmitidas por vectores infectados, como lo pueden ser ciertas especies de garrapata, de pulga o de piojo; el modo de infección es por picadura o por contaminación de heridas localizadas en la piel o las mucosas con vectores aplastados o sus heces.

No existe transmisión directa de persona a persona, las garrapatas sirven como vector y como hospedero de varias especies de *Rickettsia*, siendo una de las de mayor importancia clínica *Rickettsia rickettsii*. El principal reservorio en México es la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, aunque existen algunos informes de transmisión por las garrapatas *Dermacentor variabilis* y *D. andersoni*, así como por *Amblyomma cajennense*, en el norte del país. Esto debe alertar al personal médico y veterinario, ya que la garrapata *R. sanguineus* y *A. cajennense* tienen distribución en todo el territorio mexicano.

Para el caso de *R. rickettsii* los hospederos vertebrados (por ejemplo, perros, gatos y roedores) no se requieren de manera sustancial, ya que el ciclo de vida

se puede realizar en la garrapata y esparcirse de manera transovárica y transestadial. El tiempo que necesita la garrapata para transmitir la *Rickettsia spp.* es de 3 a 6 horas sobre el hospedero, la cual pasa a través de las glándulas salivales a los pequeños vasos del hospedero. También puede ocurrir la transmisión por la hemolinfa, durante la alimentación de las garrapatas o piojos, si son removidos con los dedos.

En México las especies de mayor importancia epidemiológica son:

- *Rickettsia rickettsii* agente etiológico de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, transmitida principalmente por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, de la cual su principal reservorio es el perro.
- *Rickettsia prowazekii* agente del tifus epidémico, su vector principal es el piojo de cuerpo humano, la gente infectada puede presentar una reincidencia de enfermedad, la cual es conocida como enfermedad de Brill-Zinsser, se desconocen las causas y las personas reincidentes pueden generar nuevos brotes.
- *Rickettsia typhi*, causante del tifus murino o endémico, los roedores son su principal reservorio y los principales vectores son las pulgas de rata y gato.

El cuadro clínico de las rickettsiosis se caracteriza por la presencia inicial de fiebre, mialgias, artralgias, postración, cefalea y escalofríos, posteriormente se presentan alteraciones del sistema gastrointestinal como lo es vómito, diarrea, náuseas y dolor abdominal. Entre el tercer y quinto día suele aparecer una erupción maculo-papulosa en extremidades o tronco que se propaga rápidamente a gran parte del cuerpo. En el quinto o sexto día, o poco después, el 40 al 60 % de los pacientes presentan un exantema petequial.

Dependiendo de la patogenicidad de la cepa y de las condiciones inmunológicas del paciente, en una etapa final se pueden presentar

alteraciones neurológicas como delirio, parálisis y convulsiones, casos que frecuentemente finalizan como decesos.

A pesar de ser una enfermedad conocida, la infección se está identificando en zonas geográficas donde no se contaba con registros. Esto derivado de la mejora en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Sin embargo, se sospecha que existen casos no informados, ya que los síntomas son inespecíficos.

El principal factor de riesgo asociado con la ocurrencia de casos graves o muertes es el retraso en la administración del tratamiento antibiótico correcto y oportuno. La gravedad de las enfermedades debidas a rickettsias es muy variada y su letalidad se encuentra entre el 5 y el 40%.

El diagnóstico de rickettsiosis por laboratorio se puede realizar mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), a través de la cual se busca el incremento, de cuatro veces o más, del título de anticuerpos en muestras pareadas, o bien mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction: PCR por sus siglas en inglés), con la cual se detecta el material genético de la bacteria. De esta manera, ambas técnicas se complementan y los resultados positivos, obtenidos por cualquiera de ellas, son igualmente válidos para que el área de atención médica pueda realizar la confirmación de un caso.

Particularmente, México es un territorio que cuenta con todos los determinantes sociales para la salud que favorecen la transmisión de las rickettsiosis, debido a la diversidad de condiciones geográficas, demográficas y socioeconómicas. Por lo tanto, como se describe en la Ley General de Salud, es fundamental llevar a cabo la vigilancia epidemiológica de las rickettsiosis y su confirmación por laboratorio.

ANTECEDENTES

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la salud pública.

La RNLSP es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, que genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación, mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) “Dr. Manuel Martínez Báez”, cuenta con la atribución de ser el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) y, desde el nivel federal, es el rector de la RNLSP, la cual a nivel estatal se representa por los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y a nivel institucional por los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE) que deciden incorporarse a la red. La RNLSP se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

La RNLSP tiene fundamento legal en la Ley General de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, componente vigilancia epidemiológica.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de las rickettsiosis

A partir de los brotes de rickettsiosis durante 2009 en Baja California y en 2012 en Coahuila, se incrementó la vigilancia epidemiológica en México.

El Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis del InDRE, como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para este diagnóstico, es el órgano rector de la RNLSP para la vigilancia por laboratorio de las rickettsiosis.

MARCO LEGAL

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. D.O.F. 06/06/23.

Leyes

- Ley General de Salud, México. Última reforma publicada D.O.F. 29/05/23.
- Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos. D.O.F. 31/05/23.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; DOF 20/05/2021
- Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F. 18/07/2016.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. DOF 2/02/2010.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, publicada, D.O.F. 19/02/2013.

- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. D.O.F. 26/10/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015

Planes y programas vigentes

- Centro Nacional para la Prevención y Control de Enfermedades. Programa de acción específico: Prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, México: Secretaría de Salud.
- Plan Nacional de Desarrollo
- Secretaría de Salud. Programa Sectorial de Salud.

Lineamientos y Manuales

- Dirección General de Epidemiología. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vector; DGAE. México: Secretaría de Salud; 2021.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de operación para la Red Nacional de

Laboratorios de Salud Pública componente vigilancia epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.

- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para la gestión del riesgo biológico; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico, InDRE. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.

DEFINICIONES OPERACIONALES

Para realizar las acciones de vigilancia epidemiológica de las rickettsiosis se deben considerar las definiciones operacionales establecidas en el Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vector (DGAE. México: Secretaría de Salud; 2023).

Caso probable de rickettsiosis:

Toda persona que presente fiebre y dos o más de los siguientes signos o síntomas; cefalea, mialgias, exantema, náusea, hiperemia faríngea, vómito, dolor abdominal, diarrea, alteraciones neurológicas, signos meníngeos, alteraciones del citoquímico del LCR, púrpura, hemorragias a cualquier nivel, alteraciones hepáticas o hematológicas, hiponatremia, leucocitosis,

leucopenia, elevación de DHL o choque y que se identifique alguno de los siguientes factores epidemiológicos:

- Presencia de vectores en áreas de residencia o visitadas en las dos semanas previas al inicio del cuadro.
- Antecedentes de visita o residencia en áreas con transmisión de rickettsiosis en las dos semanas previas al inicio del cuadro clínico.
- Existencia de casos confirmados en la localidad.
- Antecedente de mordedura de garrapata o contacto con perros en las dos semanas previas al inicio del cuadro.

Caso confirmado de rickettsiosis:

Todo caso probable en quien se confirme la presencia de *Rickettsia spp.*, mediante pruebas de laboratorio directas o indirectas reconocidas por el InDRE.

Caso descartado de rickettsiosis:

Todo caso probable en quien no se identifica la presencia de *Rickettsia spp.*, mediante las pruebas de laboratorio directas o indirectas reconocidas por el InDRE.

En menores de 5 años se puede considerar solo la fiebre y la identificación de alguna asociación epidemiológica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de las rickettsiosis, los procedimientos estandarizados de diagnóstico, control de calidad y referencia, con el fin de

generar un diagnóstico confiable y oportuno, garantizando la calidad en los resultados obtenidos.

Objetivos específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico por laboratorio de las rickettsiosis.
- Ser el documento guía para la RNLSP, en el ámbito técnico-científico del diagnóstico por laboratorio de las rickettsiosis.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia de las rickettsiosis.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LAS RICKETTSIOSIS

Como LNR, es responsabilidad del Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis del InDRE la coordinación de la RNLSP para este diagnóstico, siendo el órgano rector de la misma para el diagnóstico, referencia, capacitación, actualización, evaluación y reconocimiento de la competencia técnica.

En el InDRE se realiza el diagnóstico de rickettsiosis mediante IFI y PCR en tiempo real, para lo cual ha recibido la transferencia de tecnología de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América, así como comparaciones inter-laboratorio con los mismos, también se realiza la determinación de especie, mediante PCR tiempo real,

como un servicio de referencia para aquellas muestras positivas a PCR de género. Actualmente, se han transferido ambas técnicas a los LESP, entre los cuales, hasta la emisión de este lineamiento cuentan con la autorización para emitir resultados de PCR en tiempo real, el LAVE, Laboratorio Central de Epidemiología de La Raza y los LESP de:

- Baja California
- Chihuahua
- Guanajuato
- Nuevo León
- Quintana Roo
- San Luis Potosí
- Sonora
- Veracruz
- Yucatán
- Zacatecas

Para el caso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, los LESP de:

- Aguascalientes
- Baja California
- Chihuahua
- Guanajuato
- Nuevo León
- San Luis Potosí
- Sinaloa
- Sonora
- Veracruz

FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RNLSP

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

- Realizar el diagnóstico de rickettsiosis siguiendo los presentes lineamientos, de acuerdo a la técnica en la que hayan sido capacitados y autorizados (IFI y/o PCR en tiempo real) por el LNR.

- Revisar que la calidad de las muestras recibidas para diagnóstico cumpla con los criterios de aceptación.
- Revisar que la documentación anexa a las muestras recibidas esté completamente llena.
- Enviar los porcentajes establecidos de muestras: para control de calidad, de serología, 500 µL del 100% positivas (con títulos) y 20% negativas (sin títulos, incluye 1as y 2as muestras), para control de calidad y referencia de PCR enviar 50µL de extracto de DNA de 100% positivas (junto con el resto de la muestra de sangre para banco).

Solicitar en un mismo oficio ambos servicios y enviar el volumen de DNA en un solo tubo, para control de calidad de PCR, 50µL de extracto de DNA del 100% de muestras indeterminadas y del 10% negativas, para los laboratorios liberados enviar para banco 100% de positivas de IFI y/o de PCR (junto con el resto de muestra de sangre), estos porcentajes pueden ser modificados por el LNR, lo cual se informa de manera individual a cada LESP vía oficio. Estas muestras se deben enviar cumpliendo los días de tránsito y con la información que deban llevar anexa, revisando previamente que cumplan con los criterios de aceptación (para el control de calidad de PCR, también enviar vía electrónica los gráficos de cada muestra y controles).

En caso de no contar con autorización para realizar el diagnóstico de rickettsiosis, enviar el 100% de las muestras recibidas al LNR, revisando previamente que cumplan con los criterios de aceptación correspondientes.

- Solicitar al LNR, con anticipación y de acuerdo a la calendarización establecida por el mismo, los controles y antígenos requeridos para realizar el diagnóstico de IFI y/o PCR, almacenarlos y utilizarlos de acuerdo a las instrucciones proporcionadas.

- Participar y aprobar con un mínimo de 90% el panel enviado por el LNR, en caso de que la evaluación del panel no sea satisfactoria, realizar un análisis causa raíz y plan de acciones; y enviarlo a la jefa del Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis del InDRE, como máximo un mes posterior a la recepción del informe del panel.
- Capacitar al personal de nuevo ingreso, generar evidencia de esta y enviarla al Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis para su conocimiento.
- Participar en las reuniones periódicas de los Comités Estatales de Vigilancia Epidemiológica con la participación de los epidemiólogos estatales y de los responsables del programa, para difundir la información necesaria respecto al diagnóstico de rickettsiosis (incluyendo la baja existencia de muestras en los casos que aplique), generar evidencia y enviarla al Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis en el InDRE.
- Conocer y aplicar los Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de las rickettsiosis, así como difundirlos a personal de todos los niveles implicados.
- Aplicar la información que le haga llegar el InDRE con respecto al diagnóstico de rickettsiosis y difundirla a todos los niveles implicados.
- Para aquellos LESP con el diagnóstico autorizado, capturar en la plataforma los resultados de las muestras procesadas dentro del estándar de servicio.
- Registrar los resultados de las muestras procesadas en los sistemas de información o registro designados para tal propósito

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia, InDRE

- Coordinar las actividades de la RNLSP para el diagnóstico de rickettsiosis.
- Participar en la actualización de la normatividad referente al diagnóstico de las rickettsiosis en México.
- Establecer, desde la rectoría los procedimientos de diagnóstico para las rickettsiosis.
- Realizar de manera transitoria el análisis de muestras que otros laboratorios de la RNLSP no puedan realizar.
- Capacitar al personal de la RNLSP en las técnicas de diagnóstico correspondientes.
- Capturar en la plataforma los resultados de las muestras procesadas para diagnóstico y referencia (qPCR especie).
- Emitir las autorizaciones, reconocimientos, y suspensiones de los diagnósticos en cuestión, de acuerdo al desempeño de cada LESP.
- Enviar a la RNLSP un panel anual para la evaluación del desempeño (mismo que no se encuentra disponible para venta ni reposición).
- Realizar el control de calidad y referencia de la RNLSP para el diagnóstico de las rickettsiosis.
- Diseñar y ejecutar el Programa de evaluación externa del desempeño y la supervisión directa o indirecta de los servicios.
- Recopilar, analizar y evaluar la información de las actividades realizadas por la RNLSP para el diagnóstico de las rickettsiosis.
- Realizar y coordinar investigaciones técnicas operacionales y epidemiológicas relacionadas con las rickettsiosis.
- Contribuir con el *Programa de acción específico para la prevención y control de las rickettsiosis*, para que la RNLSP trabaje en forma conjunta, de acuerdo con las necesidades de diagnóstico.

- Proporcionar asesoría y soporte a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública respecto al diagnóstico de rickettsiosis.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

El procedimiento para la toma de muestra sanguínea está descrito en la OMS/SIGN: Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos. Organización Mundial de la Salud, 2011; así como en las directrices de la OMS sobre la extracción de sangre: las mejores prácticas en la flebotomía (WHO *Guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*. Organización Mundial de la Salud, 2010).¹

Para la obtención del suero se utiliza un tubo sin anticoagulante (tubo Vacutainer® con tapón rojo o amarillo). Para efectuar la separación de suero, una vez tomada la muestra, dejar el tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la retracción del coágulo, separe el coágulo formado con un aplicador de madera estéril y en condiciones de esterilidad, centrifugar el tubo de 2,500 a 3,000 rpm durante 10 min. Colocar el suero en tubos estériles, de plástico con capacidad de 1.5 ml con tapón de rosca, rotular y sellar con papel parafinado (realizar este paso en condiciones de esterilidad). Si no se cuenta con la infraestructura para efectuar la separación del suero, se puede enviar el tubo en el que se realizó la toma; conservar siempre la muestra en cadena fría (2-6°C).

Para la obtención de sangre completa se utiliza un tubo tipo Vacutainer® de tapón azul, con citratos como anticoagulante o, en su defecto, un tubo tipo

¹ http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44294/1/9789241599221_eng.pdf

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75247/1/9789243599250_spa.pdf

Vacutainer® de tapón lila con EDTA, una vez tomada la muestra se debe homogenizar por inversión y colocar en una gradilla.

Si se trata de una biopsia *post-mortem*, esta debe de ser enviada en solución salina, el volumen de esta debe de ser 10 veces el tamaño de la muestra de tejido.

La muestra debe ser enviada junto con el formato impreso de la plataforma de caso de enfermedades transmitidas por vector SINAVE-ETV correcta y completamente lleno.

Transportar los tubos colocados en una gradilla que se encuentre dentro de una hielera, estos deben colocarse en posición vertical, cubiertos por una gasa o apósito grueso para evitar su movimiento, y sobre la gasa se deben colocar geles refrigerantes congelados para mantener la temperatura interior de la hielera entre 2 a 8 °C.

El transporte de las biopsias debe efectuarse en frascos perfectamente sellados y en una hielera que contenga geles refrigerantes para mantener la temperatura interior entre 2 a 8 °C y evitar que los frascos se vuelquen y puedan derramarse.

En ambos casos, se requiere triple embalaje (para el transporte aéreo, el embalaje secundario o el exterior deben ser rígidos), que cumpla y siga la instrucción de embalaje correspondientes.

Condiciones de toma y envío más detalladas por tipo de muestra se pueden consultar en la Tabla 1.

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Tabla 1. Condiciones de toma y envío y criterios particulares de aceptación de acuerdo al tipo de muestra requerido para cada técnica

| Técnica | Muestra requerida | Condiciones de toma | Criterios particulares de aceptación |
|---------|--|--|---|
| IFI | Suero | La primera muestra se toma en la etapa aguda de la enfermedad (≤ 14 días) La segunda muestra se toma como mínimo después de 2 semanas respecto a la primera y antes de 3 meses después de iniciados los síntomas. | <ul style="list-style-type: none"> - Volumen mínimo 500 microlitros - Es importante que la muestra no esté hemolizada, lipémica o contaminada - Tubo de plástico u otro material que no se rompa y de cierre hermético |
| PCR | Sangre total | El paciente debe cursar la etapa aguda de la enfermedad (≤ 14 días) Si el paciente continúa con síntomas, la muestra se puede tomar aunque exceda el tiempo de evolución. | <ul style="list-style-type: none"> - Volumen de 3 a 5 mililitros - Anticoagulante, citratos o EDTA - Tubo de plástico u otro material que no se rompa y de cierre hermético |
| | Tejido u órgano proveniente de necropsia | Cualquier órgano, preferentemente hígado, pulmón, riñón o bazo. | <ul style="list-style-type: none"> - Tamaño: 3 x 3 x 1 cm - Contenido en solución salina fisiológica estéril y en envase estéril de plástico (u otro material que no se rompa), con boca ancha y tapa de rosca, herméticamente cerrado y de tamaño que permita la fácil extracción del tejido |

Criterios de aceptación y rechazo

Criterios generales de aceptación:

- Concordancia entre información documental y contenedor primario.
- Contenedor primario de dimensiones adecuadas para manipular el tipo de muestra, cerrado herméticamente.
- Cumplimiento del tiempo de tránsito de todas las muestras:
 - Para muestras de control de calidad, referencia y banco: menos de 2 semanas entre la llegada al laboratorio de diagnóstico y la llegada al InDRE.
 - Para muestras de diagnóstico: menos de 3 semanas entre toma y recepción en el laboratorio de diagnóstico.
- Muestra con oficio de solicitud de estudio, indicando justificación de envío.
- Muestra conservada en red fría (2 a 8°C).
- Muestras enviadas con estudio de caso, impreso directamente de la plataforma SINAVE-ETV, debidamente llenado con los datos de identificación del médico tratante, identificación del caso (nombre del paciente, edad, sexo, lugar de residencia, ocupación, sintomatología completa), datos epidemiológicos que permitan identificar factores de riesgo, indispensable incluir la fecha de inicio de síntomas (debe ser concordante entre primera muestra y las subsecuentes, cuando aplique) y fecha de toma de muestra; e indicando que se trata de una primera o segunda muestra (cuando aplique); y si el paciente ha recibido tratamiento (incluya nombre del medicamento, dosis y fecha de inicio y término).

Criterios de rechazo:

- Contenedor primario con muestra derramada.
- Contenedor primario sin identificación del paciente.
- Contenedor primario sin muestra.
- El paciente no cumple con definición de caso.
- Falta de concordancia entre información documental y contenedor primario de muestra.
- Falta de conservación en red fría.
- Incumplimiento a las condiciones de toma y envío, aceptación y especificaciones de la Tabla 1.
- Incumplimiento a los tiempos de tránsito.
- Muestra hemolizada, contaminada, lipémica, con volumen insuficiente.
- Muestras sin fecha de inicio de síntomas y/o toma.
- Sin formato impreso de Estudio epidemiológico de caso de ETV de plataforma SINAVE.

Muestras de alto valor

Se considera muestra de alto valor o muestra concesionada a aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación, pero que; sin embargo, por las características de evolución del paciente, se considera una muestra de alto valor epidemiológico. Cuando el laboratorio opta por procesar la muestra concesionada, se debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado, siendo únicamente responsabilidad del solicitante del servicio, el uso de este.

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico por laboratorio de las rickettsiosis se establece, en la Fig. 1, el algoritmo de análisis, en el cual se indica que, a todo caso probable, se le deberá tomar una muestra para qPCR y otra para inmunofluorescencia indirecta y se procederá a procesar primeramente la qPCR. En la situación de obtenerse un resultado positivo se confirma el caso (también se procede a determinar la especie por qPCR, proceso únicamente realizado en el InDRE actualmente); y ya no será necesario realizar la prueba de IFI en la muestra de suero, solo en caso de un resultado negativo o indeterminado de qPCR. En este último, se procederá a procesar la primera muestra de suero por IFI y posteriormente se solicitará la segunda muestra de suero para búsqueda de seroconversión.

En caso de solo recibir un tipo de muestra, se debe procesar de acuerdo a la técnica que corresponda y de tratarse de muestra de suero, tanto el médico tratante como el área de vigilancia epidemiológica, deberán asegurar la toma de la segunda muestra, para que el laboratorio de procesamiento cuente con los elementos para otorgar un resultado.

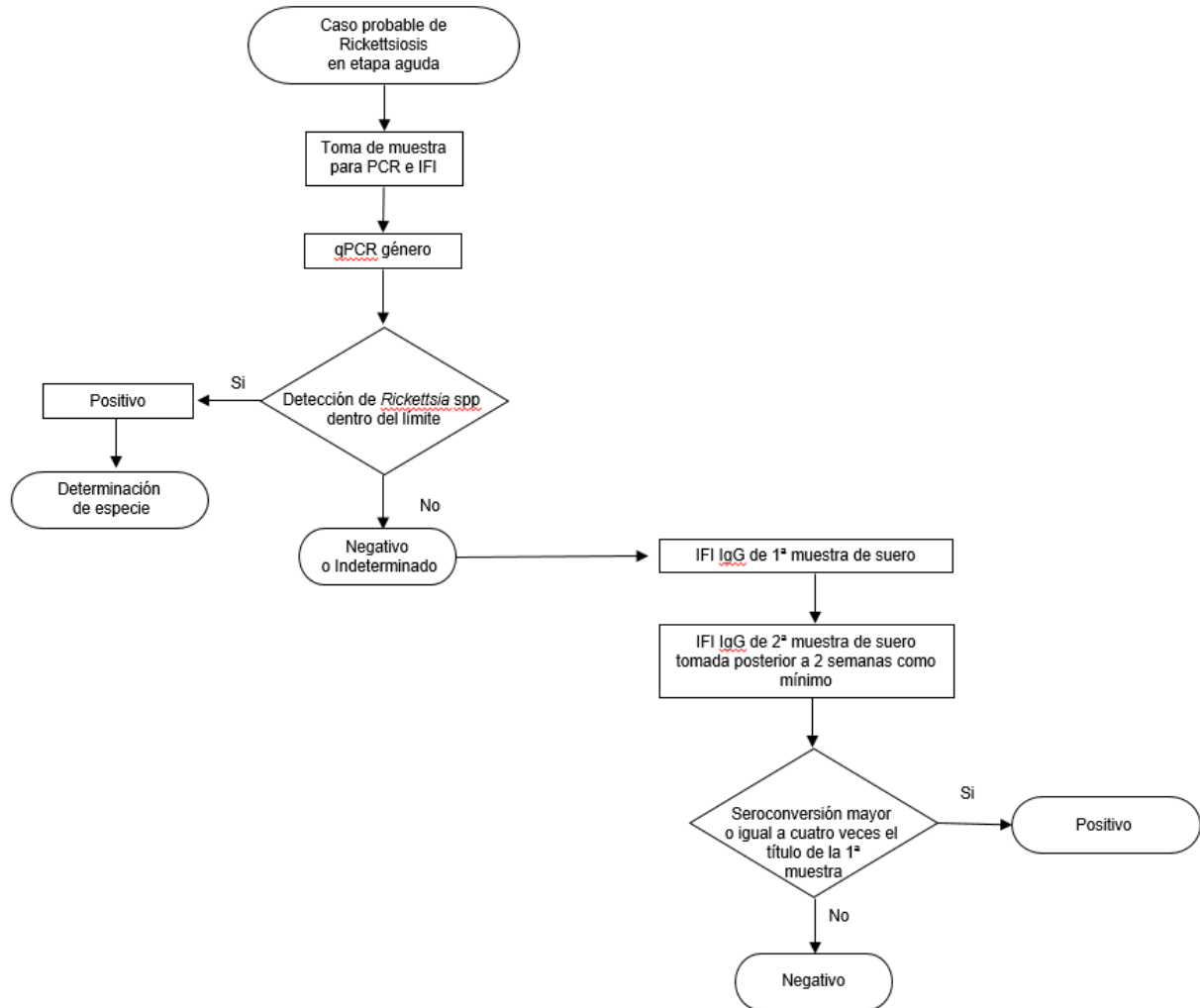


Fig. 1. Algoritmo para el diagnóstico de las rickettsiosis, por medio de IFI y qPCR. Clave de tabulador: 1B7570000

CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012, En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar a la planeación del Sistema Nacional de Salud, para reforzar las acciones de

atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP, es indispensable apegarse a los Criterios de operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública componente vigilancia epidemiológica, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad, en apego a los requisitos de las normas ISO (International Organization for Standardization) 9001, Sistemas de Gestión de la Calidad, requisitos e ISO 15189 Requisitos de la calidad y competencia, ambas en su versión más reciente.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el Manual para la evaluación del desempeño, a los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP.

Fase pre-analítica: Estos indicadores (oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo), comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica que inciden en la calidad de la muestra.

- **Oportunidad en la toma:** Días transcurridos entre la toma de la muestra y la fecha del inicio de los síntomas (≤ 14 días).
- **Oportunidad en el envío:** Días transcurridos entre la toma de la muestra y la recepción de la misma en el laboratorio de procesamiento para diagnóstico (< 3 semanas).
- **Oportunidad en el envío al InDRE:** Días transcurridos entre la llegada de la muestra al laboratorio de diagnóstico y la llegada al InDRE para control de calidad, referencia, etc. (< 2 semanas).
- **Porcentaje de rechazo:** Proporción de muestras rechazadas que no cumplen con las especificaciones de calidad para el procesamiento de las mismas. Cuando se registre $\geq 10\%$ del rechazo, el laboratorio deberá

comunicar al área de vigilancia epidemiológica las áreas de oportunidad registradas para que esta se encargue de reducirlas.

Los indicadores de la fase analítica (estándar del servicio) y fase post-analítica (oportunidad en la emisión del resultado) competen a la RNLSP e inciden en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del servicio:** El estándar de servicio para la emisión de resultados para el diagnóstico de las rickettsiosis es de 8 días hábiles para PCR y 6 días hábiles para inmunofluorescencia, para el caso de las muestras que sean negativas a PCR y posteriormente se procesen por inmunofluorescencia el estándar será de 14 días.

Fase post-analítica: (emisión del resultado) compete al laboratorio de procesamiento e incide en el registro oportuno de un resultado en el sistema de vigilancia epidemiológica.

- **Emisión del resultado:** Una vez obtenido el resultado, se cuenta con un máximo de 24 horas (1 día hábil), para el registro del resultado en la plataforma de información del sistema de vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vector. Una vez registrado el resultado, deberá concluirse el estatus del registro. De lo contrario, se considerará como omisión en la emisión del resultado.

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

Es responsabilidad de cada laboratorio participar en el PEED, mismo que es enviado por el InDRE por lo menos una vez al año. El cual tiene como objetivo evaluar el desempeño de los laboratorios participantes, para detectar áreas de oportunidad en los mismos y/o necesidades de capacitación.

CRITERIOS PARA LA AUTORIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXÁMEN

Para que un Laboratorio Estatal de Salud Pública o Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica se integre a la RNLSP para la vigilancia de las rickettsiosis, este requiere:

- Informar mediante oficio que se cuenta con el capital humano (titular y suplente), la infraestructura, equipos, reactivos e insumos indicados por el LNR, así como una vigilancia epidemiológica de las rickettsiosis.
- Contar con personal capacitado por el InDRE y con calificación aprobatoria. Una vez que el laboratorio cumpla con los requisitos antes mencionados se debe notificar vía oficio al InDRE para que se inicie una inter-comparación de resultados y se incluya al laboratorio solicitante al Programa de evaluación externa de desempeño. En esta etapa aún no puede emitir sus resultados obtenidos (en caso de que su desempeño sea menor al 80% en la evaluación mencionada, deberán realizar un análisis causa raíz y enviarlo a la jefatura del Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis del InDRE, junto con su plan de acción).
- Contar con método dado de alta ante la Dirección de Servicios y Apoyo Técnico.
- Contar con un protocolo de verificación del método concluido.
- Contar con una cédula de supervisión aprobada.

Una vez cumplidos los pasos anteriores se autorizará la implementación y emisión de resultados, lo que va ligado al envío inmediato por parte del LESP al InDRE del porcentaje de muestras establecidas para control de calidad que le sean solicitadas.

En caso de que el desempeño de un laboratorio sea consecutivamente satisfactorio, tanto en los paneles enviados por el InDRE, como en el control de

calidad, que demuestre que cuenta con el recurso humano capacitado en el método de examen, así como capacidad instalada para proporcionar el servicio los próximos 12 meses y que cuente con reconocimiento a la competencia técnica vigente, queda abierta la posibilidad de que el InDRE solicite muestras para referencia y/o banco.

BIBLIOGRAFÍA

1. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, EU: Centers for Disease Control and Prevention; 04 Noviembre 2010 [actualizado 04 Noviembre de 2010; acceso 9 de mayo de 2013]. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF): Symptoms, Diagnosis and Treatment [6 pantallas]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/rmsf/symptoms/index.html>
2. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades: Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas y Organización Mundial de la Salud [Internet]. Atlanta, Georgia USA; fecha de publicación 2004 [fecha de actualización no disponible; acceso junio 2013]. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Sensibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo [410 páginas]. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16330s/s16330s.pdf>
3. Dantas F. Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infectious Disease. 2007; 7:724-32
4. Dumler J., Walker D. Rocky Mountain Spotted Fever-Changing Ecology and Persisting Virulence. The New England Journal of Medicine. 2005; 353(6): 551-553.
5. Eremeeva M., Dasch G. Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications. Frontiers in public health. 2015; 3: 1-17.
6. Kato C, Chung I, Robinson L, et. al. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. 2013; 51(1):314-7
7. Manual Estandarizado para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vectores de la Dirección General de Epidemiología.
8. Merhej V., Angelakis E. et.al. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. Infection, Genetics and Evolution. 2014; 25:122-137
9. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012 Para la vigilancia epidemiológica.

10. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014. Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y Especificaciones de manejo.
12. OMS/SIGN: carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos. Suiza: Organización Mundial de la Salud. 2011 [consulta 22 de diciembre de 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75247/1/9789243599250_spa.pdf
13. Parola Ph., Paddock Ch., et.al. Thick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 18(4):719-756.
14. Parola Ph., Paddock Ch., et.al. Update on Thick-Borne Rickettsioses around the world: a Geographic Approach. Clinical Microbiology Reviews. 2013; 26 (4): 657-702.
15. WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy [Internet]. Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2010 [consulta 22 de diciembre de 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44294/1/9789241599221_eng.pdf

ANEXOS

Anexo I: Bioseguridad

El algoritmo de diagnóstico de rickettsiosis, de acuerdo a la evaluación de riesgos, se debe trabajar en un laboratorio con nivel de bioseguridad 2 (BSL2), sin corrientes de aire, ordenado y libre de polvo.

El personal debe portar en todo momento el equipo de protección personal, como guantes de látex o nitrilo, lentes de seguridad, bata blanca de laboratorio, zapato de seguridad, así como ejercer buenas prácticas de laboratorio.

Las muestras biológicas deben ser manipuladas antes de su dilución o inactivación en gabinete/cabinas de bioseguridad clase II.

Aunque el antígeno contenido en laminillas está inactivado, estas deben ser consideradas altamente infecciosas y ser manipuladas con precaución y con el equipo de protección personal.

Realizar la clasificación y manejo de los residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI), de acuerdo a la normativa vigente aplicable en México.

Anexo II: Técnica de inmunofluorescencia indirecta

Áreas

- Laboratorio de bioseguridad nivel 2, para realizar técnicas serológicas.
- Cuarto o área oscura para la observación de laminillas con fluorescencia.
- Área de lavado de material.

Equipo

- Parrilla con agitación magnética.
- Agitador semiautomático.
- Balanza semi-analítica.

- Baño María o incubadora a 37°C.
- Bomba de vacío.
- Congelador.
- Cronómetro digital.
- Gabinete de bioseguridad clase II/A2.
- Microcentrífuga.
- Micropipeta mecánica de volumen variable de 100-1000 µL.
- Micropipeta mecánica de volumen variable de 10-100 µL.
- Micropipeta mecánica de volumen variable de 0.5-10 µL.
- Micropipeta mecánica de volumen variable de 30-300 µL.
- Microscopio binocular, para fluorescencia.
- Refrigerador.
- Ultracongelador.

Biológicos

- Antígeno para *R. rickettsii*.*
 - Antígeno para *R. typhi*.*
 - Anticuerpo anti IgG (específico de cadena gamma) humano, obtenido en cabra, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).
 - Albumina sérica bovina fracción V.
 - Suero de conejo (conejo en blanco de bioterio).
 - Suero testigo negativo para las especies de *Rickettsia*.
 - Suero testigo positivo para las especies de *Rickettsia*.
- * El Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis del InDRE, produce el antígeno para las especies del género *Rickettsia* para el diagnóstico serológico.

Materiales

- Bolsas de plástico con cierre hermético (tipo Ziploc®).
- Bolsas para eliminación de residuos.
- Caja de plástico o madera para almacenar portaobjetos.
- Contenedores para descontaminación de material.
- Cubrebocas.
- Cubreobjetos de vidrio No. 2. Rectangular o cuadrado, con espesor de 0.25 mm y dimensiones 24 x 50.
- Estuche de vidrio para tinción (caja y rejilla para lavado de laminillas).
- Guantes de nitrilo.
- Jeringas desechables.
- Lentes de seguridad.
- Matraz de vidrio refractario, con graduación aproximada y con labio tipo Erlenmeyer. Para volúmenes de 500 mL y 1000 mL.
- Microplacas de reacción de polipropileno, de 96 pozos, sin alta adherencia.
- Microviales de 1.5 mL, estériles.
- Papel absorbente.
- Papel parafinado (Parafilm®).
- Pipetas desechables.
- Piseta.
- Portaobjetos con 8 o 12 o 24 pozos recubiertos con teflón.
- Probeta graduada, capacidad de 500mL o 1000 mL.
- Puntas estériles para micropipeta de 100 a 1000 μ L.
- Puntas estériles para micropipeta de 1 a 10 μ L .
- Puntas estériles para micropipeta de 20 a 200 μ L .
- Recipientes de polipropileno para la toma de reactivos con micropipeta. multicanal.
- Soportes de plástico tipo ELISA con tapa.

- Unidad de filtración tipo pirinola de 0.22 µm.
- Unidades de filtración con capacidades de 125 mL o 250 mL.
- Vaso de precipitados de 1000 mL

Reactivos

- Agua destilada.
- Glicerina (10% en PBS) o líquido de montaje.
- Negro de eriocromo al 10% o azul de Evans al 1%.
- PBS comercial o reactivos para prepararlo (cloruro de sodio anhidro, fosfato de potasio monobásico anhidro, fosfato de sodio dibásico anhidro. (Ver preparación en anexos).
- Sílica gel (gel de sílice) o algún otro agente desecante.
- Timerosal.

Soluciones desinfectantes

- Hipoclorito de sodio al 1 %.
- Etanol al 70%.

Registro de la muestra

Se asigna a la muestra un número consecutivo interno y se registran los datos de la misma en el formato correspondiente.

Preparación de la muestra

Las muestras se disponen de acuerdo a su número y al orden de registro en el formato de trabajo. Posteriormente, se colocan en el mismo orden en las placas de reacción, para facilitar su identificación (importante homogenizarlas previamente con agitador tipo vortex), al igual que los controles en los diferentes pozos de la microplaca.

Para evidenciar la presencia de anticuerpos IgG, se prepara una dilución 1:64 de la muestra, de la siguiente manera: se agregan en una microplaca 150 μ L de diluyente PBS-albúmina (ver preparación en anexo III) y 10 μ L del suero de la muestra, obteniendo una dilución inicial de 1:16, de la cual, posteriormente se realizan diluciones seriadas, 1:32 y 1:64 en la misma microplaca (100 μ L de la dilución, más 100 μ L de diluyente). A partir de esta última, se toman las diluciones para colocar en los portaobjetos que contienen el antígeno fijado correspondiente (el antígeno debe estar protegido de la luz, humedad y conservado a $-70^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, en bolsas tipo Ziploc®). Solo se deben sacar las laminillas de antígeno que se van a utilizar inmediatamente, ya que las sobrantes no se podrán utilizar posteriormente.

Las diluciones de los controles se realizan adicionando 155 μ L de diluyente y 5 μ L de control (positivo o negativo), para obtener una dilución 1:32. Posteriormente, se hacen dos diluciones más para obtener las de 1:64 y 1:128 (100 μ L de la dilución más 100 μ L de diluyente), esta última es la que se utilizará durante la técnica.

Ensayo de la muestra

Previo a iniciar el ensayo, colocar en desecador las laminillas con antígeno 10 a 15 min (únicamente las que se van a utilizar en ese ensayo). Adicionar 15 μ L de la dilución 1:64, previamente preparada, en un pozo de portaobjetos de cada especie de *Rickettsia*. Se incuban los portaobjetos en baño húmedo a $37^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ durante 30 min. Se lava cada uno de los portaobjetos con solución de PBS 1x y una piseta (cuidando no dirigir el chorro sobre el pozo con antígeno), se colocan en una rejilla, para que se realicen 3 lavados, por 5 minutos cada uno, con PBS 1x, con ayuda de una parrilla con agitación magnética, posteriormente se dejan secar.

Adicionar 15 μL de anticuerpo anti-inmunoglobulina IgG (diluida de acuerdo a lo determinado previamente durante su titulación-Ver anexo III), en cada uno de los pozos de los cubreobjetos. Se incuba en baño húmedo a 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, cada uno de los portaobjetos se lava con solución de PBS con una piseta (evitando que el chorro toque los pozos con antígeno), los portaobjetos se colocan en una rejilla para que se realicen 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x, empleando una parrilla con agitación magnética. Pasado este tiempo se agregan 300 μL de negro de eriocromo al 10 % (la cantidad y concentración pueden ajustarse en caso de que el contraste no se distinga, también puede utilizarse azul de Evans al 1%), como colorante de contraste, durante 5 minutos y se desecha la solución en la tarja o de acuerdo a los procedimientos internos del laboratorio. Se lavan los portaobjetos nuevamente con PBS por 5 minutos, posteriormente se secan hasta eliminar el agua contenida en las laminillas. Se adiciona en cada uno de los pozos una gota de líquido de montaje y finalmente se coloca un cubreobjetos.

Si durante la lectura de las reacciones en alguna muestra se observa positividad para más de una especie o si se presenta reacción en una especie, pero ésta es demasiado intensa, se procede a repetir la técnica realizando diluciones dobles seriadas mayores, con ambas especies (dependiendo de la intensidad de la reacción observada, hasta 128, 256, 512, 2048, 4096, etc.), hasta encontrar aquélla en la que solo se observe reacción en una especie o la ausencia de fluorescencia, Tabla 2.

Tabla 2. Guía de lectura y diluciones sugeridas a realizar.

| Lectura | Porcentaje de reacciones específicas en el pozo | Dilución sugerida |
|-----------|---|--------------------------|
| 0 o 0.5 + | < 25 | Ninguna (negativo) |
| 1+ | De 25 a <50 | Ninguna (positivo 1: 64) |
| 2+ | De 50 a <75 | Hasta 1: 2048 |
| 3+ | De 75 a <100 | Hasta 1: 8192 |
| 4+ | 100 | Hasta 1: 65536 |

Lectura microscópica

Observe las laminillas al microscopio de fluorescencia con objetivo 40X, registre la lectura de cada pozo en el formato de trabajo.

Las reacciones positivas son aquellas que presentan morfologías bacilares con fluorescencia de alta intensidad y color verde manzana, distribuidas de manera homogénea en todo el pozo y que puede ser intracelular o extracelular, Tabla 2.

Las reacciones negativas son aquellas que:

- No exhiben fluorescencia.
- Presentan fluorescencia que no es homogénea a lo largo de la preparación y que tiende a acumularse en la periferia.
- Presentan un color verde opaco como fondo o en ciertas estructuras, pero sin identificarse morfologías bacilares.

Informe de resultados

Informar el título y especie que presentaron mayor reacción e indicar si hay presencia o ausencia de seroconversión (un aumento de 4 veces el título de anticuerpos, respecto al encontrado en la primera muestra, si en la primera

muestra se presentó un título $<1:64$, en la segunda muestra se debe presentar un valor mayor o igual a $1:256$)

*En observaciones del informe de resultados indicar “Se incluyeron en el análisis los antígenos *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia typhi*, se informa aquel en el que se detectó mayor reacción, pero cabe mencionar que mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta no se puede conocer la especie causante, debido a que entre las especies del género *Rickettsia* existen reacciones cruzadas. Una segunda muestra debe presentar seroconversión (aumento de por lo menos 4 veces el título de la primera muestra), para considerarse como un resultado final positivo”.

Control de calidad

En cada ensayo de muestras se incluyen controles positivos y negativos por cada especie analizada.

Interferencias

Contaminación, lipemia y hemólisis de los sueros.

Intervalo biológico de referencia

Título $< 1:64$ en primera muestra.

Intervalo reportable

El menor título a informar es $1:64$, en algunas muestras con carga de anticuerpos alta se requiere realizar una titulación de la muestra a partir de diluciones dobles seriadas; y en estos casos no hay un valor máximo definido, depende de los anticuerpos presentes en la muestra.

Fuentes de variabilidad

Exposición a la luz: Un tiempo prolongado de exposición de las laminillas procesadas a luz ambiental y luz del microscopio de fluorescencia, disminuye o elimina la fluorescencia de las reacciones obtenidas. Una exposición prolongada del anticuerpo anti IgG a la luz ambiental, también puede disminuir o eliminar su reacción.

Almacenamiento del antígeno y portaobjetos: Los viales de antígeno se mantienen a una temperatura de -70 ± 4 °C, así como los portaobjetos que ya se encuentren fijados con el mismo, para lograr su preservación.

Preparación del anticuerpo anti IgG: El anticuerpo anti IgG humano debe centrifugarse al momento de diluirlo y agregar a la reacción, esto para evitar en la lectura la posible formación de precipitado en la reacción, por lo que se debe preparar al momento de utilizarlo y protegerlo de la luz.

Anexo III: Preparación de reactivos para la técnica de inmunofluorescencia indirecta

- Se utiliza PBS 10X comercial o se puede preparar de la siguiente manera:

| Reactivo | Cantidad |
|-------------------------------|-----------|
| Fosfato dibásico de sodio | 17gramos |
| Fosfato monobásico de potasio | 4 gramos |
| Cloruro de sodio | 85 gramos |

Se mezclan los diferentes reactivos hasta su completa disolución en agua destilada, se ajusta el pH a 7.2-7.4 con una solución de hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Se afora a 1L en un matraz. Finalmente se filtra con membrana de 0.22 μ m.

- Preparación del diluyente de las muestras.

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------------------|--------------|
| Albúmina sérica bovina, fracción V | 2.5 gramos |
| Timerosal | 0.025 gramos |
| PBS 1X | 250 mL |
| Suero de conejo descomplementado | 2.5mL |

Se disuelve el timerosal en PBS y posteriormente la albúmina. Se incorpora el suero de conejo previamente descomplementado ($56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos) y filtrado con membrana de $0.22\ \mu\text{m}$. La solución final se filtra con membrana de $0.22\ \mu\text{m}$. Se etiqueta y se guarda en refrigeración hasta su uso, que debe ser en condiciones de esterilidad.

- Líquido de montaje

| Reactivo | Cantidad |
|-----------|----------|
| PBS 1X | 1 mL |
| Glicerina | 9 mL |

Se mezclan ambos reactivos para obtener el líquido de montaje.

Anexo IV: Determinación de dilución óptima del conjugado, mediante titulación, para la técnica de inmunofluorescencia indirecta

1. Se seleccionan los siguientes controles o muestras:
 - Control positivo para *R. rickettsii*
 - Control positivo para *R. typhi*
2. Las muestras o controles se ordenan en el formato “Determinación de la dilución óptima del conjugado, mediante titulación” y posteriormente se

colocan, en el mismo orden, en las placas de reacción para rastreo durante la lectura, al igual que el control negativo.

3. Se prepara una serie de diluciones dobles seriadas (p.ej.: 1:16 a 1:1024 , 1:256 a 1:16384, según el título de la muestra) para los sueros positivos. El control negativo únicamente en dilución 1:64.
4. Se adicionan 15 µl de la dilución 1:64 del control negativo en el pozo 1 de la laminilla, previamente sensibilizada con el antígeno para cada especie, y del pozo 2-8 se coloca cada una de las diluciones específicas (p. ej. 1:16 a 1:1024 y 1:256 a 1:16384)

Se debe tener en cuenta que por cada dilución de conjugado se utilizan dos laminillas:

- *Una laminilla para R. rickettsii.*
- *Una laminilla para R. typhi*

5. Se lleva a cabo la técnica de IFI. Al momento de adicionar el conjugado anti IgG se realizan los cálculos correspondientes a la dilución a evaluar (p. ej. 100, 200, 400, 450, 500 y 550), de acuerdo a la formula siguiente:

IgG =

$$\frac{(\text{No. de pozos} + 1 \text{ pozo de exceso})(\text{Número de especies})(\mu\text{L de conjugado adicionado a la laminilla p.ej. } 15 \mu\text{L})}{\text{Dilución (p.ej. } 100, 200, 400, 450, 500 \text{ o } 550)}$$

El resultado total de esta operación nos indicará la cantidad en µL a utilizar del conjugado anti IgG concentrado, mientras que el resultado del dividendo nos indica la cantidad de diluyente a utilizar para llevar a cabo la dilución. Se prepara el conjugado para cada una de las

diluciones. Se homogeniza con agitador tipo vortex y se centrifuga a 5500 rpm durante cinco minutos.

- La dilución óptima es aquella en la que se observa una reacción positiva en el título de referencia, para todos los sueros probados.

Se pueden registrar los resultados en un formato como el que se muestra en la Figura 2.

Figura 2. “Determinación de la dilución óptima del conjugado, mediante titulación”

| DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DEL CONJUGADO MEDIANTE TITULACIÓN | | | | | | | | | |
|---|------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------|---------------------------------|------------|--------|--------|---------|
| Tipo de conjugado: | | Muestra/Control: | | | Fecha de proceso/lectura: | | | | |
| Marca del conjugado: | | Lote N°: | | Catálogo: | | Caducidad: | | | |
| Dilución de la inmunoglobulina | <i>Rickettsia rickettsii</i> | CONTROL (-) | Dilución de la Muestra/Control | | | | | | |
| | Pozo | 1 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | 1:2048 | 1:4096 | 1:8192 | 1:16384 |
| | Laminilla | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| MUESTRA TITULOS ALTOS | | | | | | | | | |
| 100 | 1 | | | | | | | | |
| 200 | 2 | | | | | | | | |
| 400 | 3 | | | | | | | | |
| 450 | 4 | | | | | | | | |
| 500 | 5 | | | | | | | | |
| 550 | 6 | | | | | | | | |
| Cálculos para la preparación del conjugado IgG: | | | | | | | | | |
| 100 | | | | | | | | | |
| 200 | | | | | | | | | |
| 400 | | | | | | | | | |
| 450 | | | | | | | | | |
| 500 | | | | | | | | | |
| 550 | | | | | | | | | |
| Centrifugar 5500 rpm durante 5 minutos | | | | | | | | | |
| Dilución óptima elegida: | | | | | | | | | |
| N° de serie del microscopio en el que se realizó la lectura: | | | | | | | | | |
| Nombre y firma del analista: | | | | | | | | | |
| Observaciones: | | | | | | | | | |
| | | | | | ETIQUETA ORIGINAL DEL CONJUGADO | | | | |

Anexo V: Técnica de extracción de ácidos nucleicos y PCR en tiempo real

Áreas de trabajo y equipo mínimo necesario para trabajar

1) Área de extracción

- Agitador tipo vortex.
- Gabinete de bioseguridad Clase II Tipo A2.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas de volumen variable con capacidad de 20 a 200 μL y 100 a 1000 μL .
- Refrigerador.
- Termoblock.

2) Área de preparación de la mezcla de reacción.

- Agitador tipo vortex.
- Congelador (preferentemente).
- Gabinete de bioseguridad Clase II Tipo A2.
- Microcentrífuga (preferentemente).
- Micropipetas de volumen variable con capacidad de 0.5-10 μL , 1-10 μL , 20 a 200 μl y 100 a 1000 μl .
- Refrigerador.

3) Área de adición de muestras

- Agitador tipo vortex.

- Gabinete de bioseguridad Clase II Tipo A2 o cabina para PCR.
- Micropipeta de volumen variable con capacidad de 0.5-10 μL o 1-10 μL .
- Refrigerador.

4) Área de adición de controles

- Agitador tipo vortex.
- Gabinete de bioseguridad Clase II Tipo A2 o cabina para PCR.
- Micropipeta de volumen variable, con capacidad de 0.5-10 μL o 1-10 μL .
- Refrigerador.

5) Área de Instrumentos

- Centrifuga para placas.
- Termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System o termociclador CFX96 Touch® Real-Time PCR Detection System.

Materiales

- Aplicadores de madera.
- Arena estéril.
- Batas desechables.
- Bolsas de polipropileno.
- Contenedores para desecho de puntas, líquidos y punzocortantes.
- Gasas.
- Gradillas para tubos Eppendorf® y tubos cónicos.
- Guantes desechables de nitrilo.
- Mango y hojas de bisturí.
- Marcadores indelebles.
- Mortero y pistilo.

- Pinzas.
- Placas de polipropileno con 96 pozos especiales para PCR en tiempo real o tiras con 8 pozos.
- Puntas con filtro estériles, para micropipeta de 0.5 a 10 µL, 10 a 100 µL, 20 a 200 µL y 100 a 1000 µL.
- Racks para refrigerar.
- Tiras con 8 tapas ópticas ultra claras, para tubos de PCR en tiempo real
- Tubos cónicos de 50 mL.
- Tubos tipo Eppendorf® estériles de 0.5 y 1.5 mL.

Reactivos y materiales biológicos

- Agua grado PCR.
- DNA de *Rickettsia spp.*
- Estuche comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), QIAGEN® catálogo 51106.
- Estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (250), QIAGEN® catálogo 51306 o buffer ATL QIAGEN® catálogo 19076 o 939011.
- Etanol al 70%.
- Hipoclorito de sodio al 1%.
- Iniciador CS-F (5-TCG CAA ATG TTC ACG GTACTT T-3).
- Iniciador CS-R (5-TCG TGC ATT TCT TTC CAT TGTG-3).
- Iniciador *RNaseP*-F (5-CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG-3).
- Iniciador *RNaseP*-P (FAM-CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC TTC-BHQ1).
- Sonda CS-P (5-6-FAM-TGC AAT AGC AAGAAC CGT AGG CTG GATG-BHQ-1-3).
- Sonda *RNaseP*-R (5-TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG-3).

- Taqman Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems® catálogo 4369016 o Illustra™ puRe Taq Ready-To-Go™ PCR Beads, GE catálogo 27-9559-01.

Proceso de extracción de ácidos nucleicos, a partir de muestras de sangre completa y líquido cefalorraquídeo

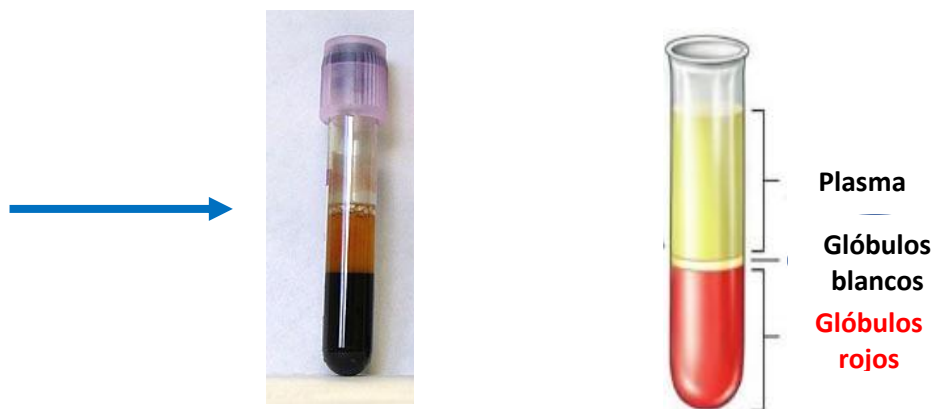
Se pueden utilizar los estuches de extracción kit QIAamp DNA Blood Mini Kit o el kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN®.

Acondicionamiento previo de las muestras

1) Sangre

Cuando la sangre no está hemolizada y el plasma está totalmente separado de los glóbulos rojos, Figura 3, el plasma se retira completa y cuidadosamente y se transfiere a un tubo limpio. Posteriormente, con ayuda de la micropipeta, se toman 400 µL de la superficie (glóbulos blancos) y se depositan en un tubo limpio de 1.5 mL.

Figura 3. Separación de fases en sangre



Si el volumen de la muestra es menor a 1 ml o está completamente hemolizada, Fig 4, esta se mezcla suavemente y se toman directamente 400 μ L para realizar la extracción.

Figura 4. Sangre hemolizada



Si la sangre se encuentra coagulada (muestra concesionada) se trabaja como tejido.

2) Líquido cefalorraquídeo

Se considera como muestra concesionada y se procesa solo en caso de que no se haya podido tomar alguna otra muestra al paciente.

- Se trabajan 400 μ l de muestra

- Si se observa turbio y el volumen de muestra es suficiente, se debe centrifugar previamente a 3500 rpm por 20 min y se toma la muestra del fondo del tubo para trabajar con el sedimento.

Metodología de extracción (para 400 µl de muestra)

1. Adicionar 40 µL de proteasa o proteinasa K a un tubo de 1.5 ml, posteriormente adicionar los 400 µL de muestra.
2. Agregar 400 µL de Buffer AL y homogenizar con agitador tipo vortex.
3. Incubar 10 min a 56°C.
4. Adicionar 400 µL de etanol y homogenizar con agitador tipo vortex.
5. Transferir la mezcla a una columna y centrifugar a 14000 rpm / 1 min. Descartar el filtrado y transferir la columna a otro tubo colector. (Repetir este paso 2 veces para pasar todo el volumen).
6. Adicionar 500 µL de Buffer AW1, dejar reposar 1 min y centrifugar a 8000 rpm / 1 min, descartar filtrado y cambiar de tubo colector.
7. Adicionar 500 µL de Buffer AW2, dejar reposar 1 min y centrifugar a 14000 rpm / 3 min descartar filtrado y cambiar de tubo colector.
8. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm / 1 min.
9. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL y adicionar el siguiente el Buffer AE (para sangre 50 µl y para LCR 25 µL)
10. Incubar por 5 min a temperatura ambiente. (15-25 °C) y posteriormente centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
11. Adicionar nuevamente Buffer AE, 50 µl para sangre y 25 µL para LCR (aunque se trabaje con menor volumen se eluye en el mismo volumen final)
12. Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
13. Conservar el DNA eluído a 4°C o -20 °C hasta su uso.

NOTA. Todos los residuos biológico-infecciosos producidos en la extracción se desechan de acuerdo al manejo RPBI, los líquidos se colectan en un frasco para su posterior manejo CRIT.

Proceso de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de tejidos

Se pueden utilizar los estuches de extracción QIAamp DNA Mini Kit o QIAamp DNA Blood Mini Kit y el buffer ATL de QIAGEN® (si presenta un precipitado blanco este se disuelve con calor (56°C).

Acondicionamiento previo de la muestra

Se trabaja una biopsia sumergida en solución salina dentro de un envase de plástico de boca ancha, Figura 5.

Si el contenido del envase se derramó, abrir dentro de un gabinete de seguridad, descontaminar el interior del contenedor y los envases con hipoclorito de sodio al 1%. Desechar el contenedor y el material usado como RPBI.

Fig. 5 Envío correcto de biopsias.



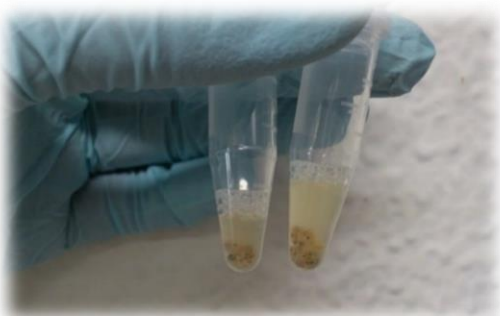
Cortar solo 50 mg (aproximadamente) del tejido con un bisturí, apoyándose en una caja de Petri (si es bazo no usar más de 10 mg), 50 mg ocupan la mitad de la marca de 0.1 en el tubo, como se muestra en la Figura 6.

Figura 6. Tamaño de biopsia que debe tomarse para la reacción de PCR.



El fragmento de órgano se disgrega directamente presionando este en el fondo y paredes del tubo de 1.5 mL, con ayuda de un aplicador grueso de madera, arena estériles y 100 microlitros del medio de transporte o agua grado PCR, Figura 7.

Figura 7. Maceración de tejido en tubo.



Otras opciones para disgregar el tejido son cortar con bisturí y utilizar mortero y unos granos de arena estéril, Figura 8.

Figura 8. Maceración de tejido en mortero.



Notas:

El tejido cerebral se disgrega fácilmente, se digiere 20 minutos a 56°C con los reactivos de QIAGEN® y al término de este tiempo se continúa la extracción.

En caso de piel, por su dureza, se recomienda disgregar en mortero con arena y posteriormente digerir por más de 10 h a 56°C con los reactivos que indica QIAGEN®, al término se continúa la extracción.

Metodología de extracción

1. Adicionar al tejido disgregado, 200 μ L de Buffer ATL, más 20 μ L de proteinasa K y dar vortex.

2. Incubar a 56 °C de 1-2 h, si es posible dar vortex ocasionalmente.
3. Adicionar 200 µl de Buffer AL y dar vortex suficiente, hasta tener una suspensión homogénea, posteriormente incubar 15 min a 70°C.
4. Centrifugar a 14000 rpm/30seg, para separar el tejido no digerido, pasar todo el sobrenadante a un tubo limpio y descartar el sedimento.
5. Adicionar 200 µL de etanol y dar vortex hasta homogenizar.
6. Transferir la mezcla a la columna y centrifugar a 8000 rpm/1 min, si no pasa todo el volumen, aumentar la velocidad. Descartar el filtrado y transferir la columna a otro tubo colector.
7. Adicionar 500 µL de Buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm / 1 min, descartar filtrado y transferir la columna a otro tubo colector.
8. Adicionar 500 µL de Buffer AW2 y centrifugar a 14000 rpm / 3 min, descartar filtrado y transferir la columna a otro tubo colector.
9. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm /1 min, descartar el tubo colector.
10. Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml y adicionar 50 µL de Buffer AE e incubar por 5 min a temperatura ambiente, al término centrifugar a 8000 rpm /1 min.
11. Adicionar nuevamente 50 µL de Buffer AE y centrifugar a 8000 rpm /1 min.
12. Conservar el DNA eluído a 4°C O -20 °C hasta su uso.

NOTA. Inmediatamente después del uso, coloque el instrumental y los demás elementos en solución de hipoclorito de sodio al 1 %, de 10 minutos a 1 hora, Figura 9. Posterior a la descontaminación todos los instrumentos se lavan perfectamente con agua y detergente, para eliminar todo el material orgánico. Los instrumentos deben limpiarse cuanto antes, después de su uso, para que ningún material orgánico se deshidrate y se adhiera.

Figura 9. Descontaminación de instrumental.



Consideraciones importantes durante el proceso de extracción:

- Abrir una columna a la vez.
- Al centrifugar, es recomendable dejar por lo menos un espacio entre cada tubo o muestra.
- Asegurarse de que el Buffer AW1 y AW2 fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Se requiere como equipo de protección personal bata de uso exclusivo del área y guantes de nitrilo.
- Todos los pasos de centrifugación se pueden realizar a temperatura ambiente (15-25°C).
- Usar puntas con filtro y cambiar de punta entre la toma de cada reactivo.

- Centrifugar a máxima velocidad (14000 rpm) no afecta el rendimiento del DNA, este paso es recomendado cuando se trabaja con el paquete leucocitario.
- Después de agitar con vortex se recomienda centrifugar brevemente.
- En cada proceso de extracción se incluye un testigo de la misma, el cual está constituido de todos los reactivos utilizados, más 200-400 µL de agua grado PCR (incluir un testigo por cada 11 muestras).
- Incubar la columna con el Buffer de elución por 5 min a temperatura ambiente incrementa el rendimiento de DNA.
- La extracción se puede realizar de forma manual o automatizada en el robot QIAcube con su adecuada "Protocol Sheet"
- Para concentrar alguna muestra se recomienda eluir hasta en 50 µl de Buffer AE
- Un tiempo largo de incubación a 56°C, no afecta el rendimiento o calidad del DNA
- Volúmenes pequeños de muestra se ajustan a 200 µL con agua grado PCR y se trabajan con la mitad de los reactivos que están indicados en los pasos 1, 2 y 4, los demás pasos no se modifican.

Proceso de preparación de mezcla para PCR para gen *gltA* del género *Rickettsia spp.*

Se pueden utilizar los estuches Illustra™ puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads o Taqman Gene Expression Master Mix. Dependiendo el reactivo, preparar en un tubo la mezcla y posteriormente adicionar 20 µL de esta a su respectivo tubo o pozo, Tabla 3.

Tabla 3. Cálculos para mezcla de reacción para gen *gltA*.

Reactivo

Illustra™ puReTaq Ready-To-Go™

PCR Beads

Marca: GE Healthcare

-Depositar la perla en el tubo o pozo correspondiente

Reactivo

Taqman Gene Expression

Master Mix

Marca: Applied Biosystems™

| Reactivo | Vol. por reacción (µL) | No. de muestras | Vol. total (µL) |
|-------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| CSF 10 pmol/µL | 1 | | |
| CSR 10 pmol/µL | 1 | | |
| CSP* 10 pmol/µL | 1 | | |
| MgCl ₂ 25 mM | 2.5 | | |
| H ₂ O | 14.5 | | |

| Reactivo | Vol. por reacción (µL) | No. muestras | Vol. total (µL) |
|-------------------------|------------------------|--------------|-----------------|
| Gene Expression | 12.5 | | |
| CSF 10 pmol/µL | 1 | | |
| CSR 10 pmol/µL | 1 | | |
| CSP* 10 pmol/µL | 1 | | |
| MgCl ₂ 25 mM | 2.5 | | |
| H ₂ O | 2 | | |

Volumen de muestra: 5 µL

Proceso de preparación de mezcla para PCR para *RNAse P* (control interno)

Se pueden utilizar los estuches Illustra™ puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads o Taqman Gene Expression Master Mix. Dependiendo el reactivo, preparar en

un tubo la mezcla y posteriormente adicionar 20 µL de esta a su respectivo tubo o pozo, Tabla 4.

Se puede utilizar cualquier reacción de *RNase P* que ya se tenga establecida en el laboratorio.

Tabla 4. Cálculos para mezcla de reacción para *RNase P*

Reactivo

Illustra™ puReTaq Ready-To-Go™

Beads

-Depositar la perla en el tubo o pozo correspondiente

| Reactivo | Vol. por reacción (µl) | No. de muestras | Vol. total (µl) |
|--------------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>RNase P</i> F 10 pmol/µL | 1 | | |
| <i>RNase P</i> R 10 pmol/µL | 1 | | |
| <i>RNase-P</i> P 10 pmol/µL | 0.5 | | |
| MgCl ₂ 25 mM | 2.5 | | |
| H ₂ O | 15 | | |

Reactivo

Taqman Gene Expression PCR

Master Mix

| Reactivo | Vol. por reacción (µl) | No. de muestras | Vol. total (µL) |
|--------------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| Gene Expression | 12.5 | | |
| <i>RNase</i> PF 10 pmol/µL | 1 | | |
| <i>RNase P</i> R 10 pmol/µL | 1 | | |
| <i>RNase-P</i> P 10 pmol/µL | 0.5 | | |
| H ₂ O | 5 | | |

Volumen de muestra: 5 µL

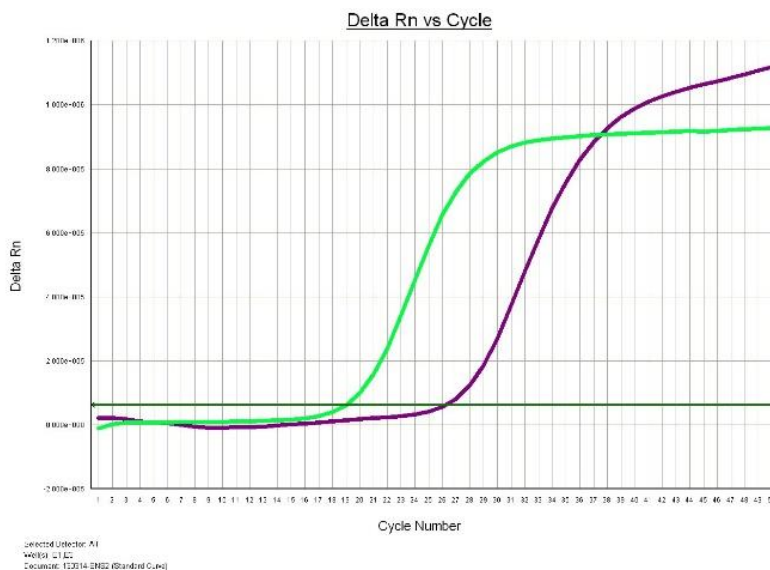
Programación de termociclado

| | | | |
|-----------|--------|-------|--------|
| 50° C | 95° C | 95° C | 60° C |
| 2 min | 10 min | 20seg | 40 seg |
| 45 ciclos | | | |

Consideraciones importantes durante el proceso de PCR:

- Al cargar los templados, usar una punta por cada muestra.
- Asegurarse que las tapas ópticas se encuentren perfectamente selladas.
- Mantener los ácidos nucleicos y reactivos de trabajo en red fría.
- Se debe utilizar bata de laboratorio exclusiva y guantes de nitrilo o libres de talco para cada una de las áreas.
- Todas las áreas de trabajo deben estar separadas entre sí y no se deben compartir los equipos ni los materiales entre ellas.
- Los gráficos para *gltA* deben ser de color morado y los gráficos para *RNaseP* de color verde.
- Ajustar el umbral (threshold) con ayuda de los controles positivos y los NTC, al inicio de la fase exponencial temprana en la reacción lineal, Figura 10.

Figura 10. Ajuste de umbral al inicio de la fase exponencial



Nota. - Una vez hidratados los iniciadores y sondas deben almacenarse en pequeñas alícuotas a -20°C o menos, solo las alícuotas de uso cotidiano pueden mantenerse en refrigeración (2-8°C).

Interpretación por el laboratorio

Positivo: La presencia de una curva sigmoide bien definida, en la que se distingan claramente las tres fases de la reacción de PCR y presente un Cq menor o igual a 38 y amplificación de *RNaseP* positivo, indica la presencia de DNA de *Rickettsia spp* en la muestra.

Negativo: sin amplificación del gen *gltA* pero con amplificación de *RNaseP*.

Indeterminado: amplificación de *RNaseP* y amplificación del gen *gltA* con un Cq mayor a 38. Los resultados indeterminados sugieren la presencia de poco DNA de la bacteria.

No adecuado: aplica para muestras concesionadas que no cumplan con los criterios de aceptación correspondientes o aquellas en las que no se detecte curva de amplificación para *RNaseP*.

Control de calidad interno:

-Control positivo gen *gltA*: DNA de *Rickettsia spp* diluido. (Cq entre 20-25 aproximadamente)

-Control positivo de *RNase P*: DNA humano

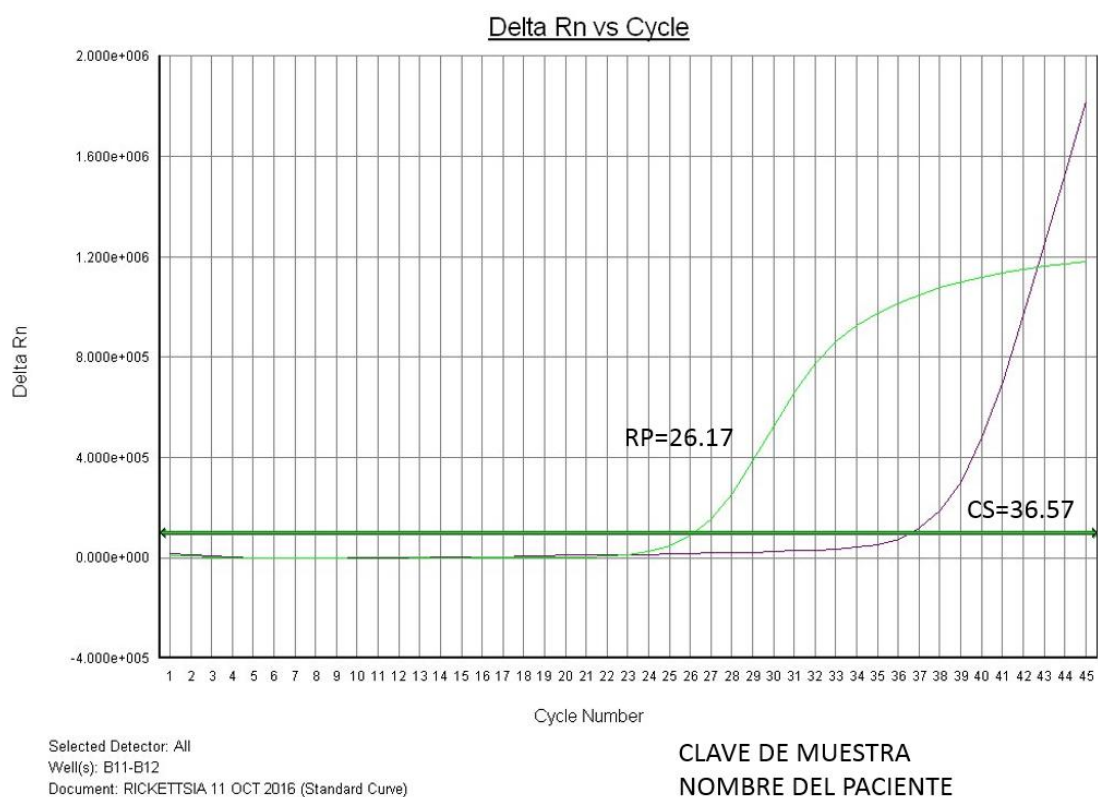
-Control NTC: agua

-Control de extracción: agua

Todas las muestras clínicas trabajadas deberán ser positivas a *RNase P*, de lo contrario repetir la reacción de PCR, si continúa negativa se debe repetir la extracción o informarla como muestra no adecuada.

En los gráficos enviados para cada una de las muestras de control de calidad, así como de los controles procesados en cada corrida, se debe indicar claramente el valor de Cq obtenido en todos los casos y la clave de identificación o nombre, Figura 11.

Figura 11. Ejemplo de envío de gráfico.



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"