

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

27. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*

2 0 0 7

Coordinador: José Ramón Blanco

Autores: Pedro Anda
José Ramón Blanco
Isabel Jado
Mercedes Marín
José Antonio Oteo
Inmaculada Pons
Aranzazu Portillo
Isabel Sanfeliu



ISBN-978 84-612-2074-8

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Anaplasmosis humana (ehrlichiosis humana granulocítica)

- 1.1. Introducción
- 1.2. Clasificación y consideraciones clínicas
- 1.3. Recogida de la muestra
- 1.4. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de microbiología
- 1.5. Procesamiento de la muestra
- 1.6. Técnicas microbiológicas
- 1.7. Criterios diagnósticos
- 1.8. Profilaxis
- 1.9. Tratamiento

2. Infección por *Bartonella* spp.

- 2.1. Introducción
- 2.2. Consideraciones clínicas
 - 2.2.1. Fiebre de Oroya (fase aguda) y verruga peruana (fase crónica)
 - 2.2.2. Enfermedad por arañazo de gato
 - 2.2.3. Fiebre de las trincheras
 - 2.2.4. Angiomatosis bacilar y peliosis hepática
 - 2.2.5. Endocarditis
- 2.3. Diagnóstico
 - 2.3.1. Métodos directos
 - 2.3.2. Cultivo microbiológico
 - 2.3.3. Serología
 - 2.3.4. Métodos moleculares
- 2.4. Tratamiento y profilaxis

3. Infecciones por *Rickettsia* spp.

- 3.1. Introducción
- 3.2. Clasificación y consideraciones clínicas
 - 3.2.1. Grupo de las fiebres manchadas
 - 3.2.2. Grupo de las fiebres tíficas
- 3.3. Recogida de la muestra
- 3.4. Transporte y conservación de la muestra
- 3.5. Manejo de la muestra en su recepción en el laboratorio de microbiología
- 3.6. Procesamiento de la muestra
- 3.7. Cultivos. Selección de medios y condiciones de incubación
- 3.8. Criterios para interpretación de resultados
- 3.9. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales
- 3.10. Información de resultados
- 3.11. Técnicas rápidas de diagnóstico
- 3.12. Procedimientos no aceptables

4. Enfermedad de Whipple

- 4.1. Introducción e historia
 - 4.1.1. Descripción de *Tropheryma whipplei*
- 4.2. Manifestaciones clínicas
- 4.3. Tratamiento
- 4.4. Epidemiología y patogénesis
- 4.5. Diagnóstico microbiológico
 - 4.5.1. Obtención y conservación de las muestras
 - 4.5.2. Procesamiento de muestras: extracción del ADN
 - 4.5.3. Detección de ADN de *Tropheryma whipplei* por PCR
 - 4.5.4. Precauciones e interpretación de resultados
 - 4.5.5. Otros métodos para el diagnóstico de laboratorio

5. Bibliografía

- 5.1. Anaplasmosis humana (ehrlichiosis humana granulocítica)
- 5.2. Infección por *Bartonella* spp.
- 5.3. Infecciones por *Rickettsia* spp.
- 5.4. Enfermedad de Whipple

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. **PNT-EMG-01.** Aislamiento de *Anaplasma phagocytophilum* a partir de muestras clínicas mediante cultivo
2. **PNT-EMG-02.** Diagnóstico de anaplasmosis humana mediante inmunofluorescencia indirecta
3. **PNT-EMG-03.** Detección directa de *Anaplasma phagocytophilum* en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR) y secuenciación
4. **PNT-EMG-04.** Diagnóstico de las infecciones por *Bartonella* spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo
5. **PNT-EMG-05.** Diagnóstico de las infecciones por *Bartonella* spp. mediante serología
6. **PNT-EMG-06.** Diagnóstico de las infecciones por *Bartonella* spp. mediante amplificación genómica y secuenciación
7. **PNT-EMG-07.** Aislamiento de *Rickettsia* spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo
8. **PNT-EMG-08.** Diagnóstico de las rickettsiosis mediante inmunofluorescencia indirecta
9. **PNT-EMG-09.** Detección directa de *Rickettsia* spp. en muestras clínicas mediante amplificación genómica y secuenciación del gen *gltA10*.
10. **PNT-EMG-10.** Detección de ADN de *Tropheryma whipplei* en muestras clínicas mediante PCR

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

27. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR PATÓGENOS BACTERIANOS EMERGENTES: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*. 2007

Coordinador: José Ramón Blanco

**Autores: Pedro Anda
José Ramón Blanco
Isabel Jado
Mercedes Marín
José Antonio Oteo
Inmaculada Pons
Aranzazu Portillo
Isabel Sanfeliu**

1. ANAPLASMOSIS HUMANA (EHRlichiosis HUMANA GRANULOCITICA)

1.1. INTRODUCCIÓN

Con los términos ehrlichiosis y anaplasmosis denominamos a un grupo de infecciones bacterianas transmitidas por garrapatas duras (*Ixodidae*) y que afectan a hombres y animales. Son de distribución universal y están provocadas por diferentes especies de los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* (familia *Anaplasmataceae*). Taxonómicamente pertenecen al orden Rickettsiales (alfa 1 Proteobacteria). Se caracterizan por ser Gram negativas, pleomórficas, y de crecimiento intracelular obligado. Recientemente, estas bacterias se han reorganizado en una nueva clasificación, que ha sido aceptada e incorporada a este texto. Una característica que las diferencia de las rickettsias es que se replican en unas vacuolas derivadas de la membrana celular de las células que infectan, principalmente leucocitos y plaquetas. *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. no crecen en los medios de cultivo habituales, precisando para su crecimiento líneas celulares (células promielocíticas HL-60 y precursores mielomonocíticos). No se tiñen con la tinción de Gram, aunque se pueden poner de manifiesto en las células que infectan, en forma de agregados citoplasmáticos denominados "mórulas", mediante las tinciones de Wright y Giemsa.

Las ehrlichias y anaplasmas se mantienen en la naturaleza en un ciclo biológico similar al de la borreliosis de Lyme (garrapata-mamífero-garrapata), siendo infectados los hombres ocasionalmente por la picadura de diferentes especies de garrapatas duras. En Europa la única garrapata implicada en la transmisión de *A. phagocytophilum* es *Ixodes ricinus*, guardando la anaplasmosis humana y la borreliosis de Lyme un inminente paralelismo, ya que comparten vector, alguno de los reservorios y como tal, ambiente epidemiológico.

1.2. CLASIFICACIÓN Y CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La primera descripción de una ehrlichiosis humana data de 1953, describiéndose en Japón el primer aislamiento de *E. sennetsu* en un paciente con un cuadro clínico similar a la mononucleosis infecciosa. Desde entonces se han implicado en patología humana nuevas especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y en la actualidad se considera que las ehrlichiosis (y anaplasmosis) son un problema emergente. En la Tabla 1 se muestran las diferentes especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* implicadas en patología humana con sus dianas y vectores.

En el área occidental son tres las especies de ehrlichias que tienen importancia por su incidencia y potencial gravedad: *E. chaffeensis*, agente productor de la ehrlichiosis humana monocítica (EHM) en Norte América; *A. phagocytophilum* (denominación actual que engloba a los antiguamente denominados: agente de la ehrlichiosis humana granulocítica, *E. phagocytophila*, y *E. equi*) productora de la anaplasmosis humana (AH) (antigua ehrlichiosis humana granulocítica), y *E. ewingii* responsable de un cuadro similar a la AH en pacientes inmunodeprimidos en Norte América. Hasta la fecha no existen datos convincentes de la presencia en Europa de otras ehrlichiosis humanas diferentes a la AH, si bien la reciente descripción de una nueva especie de *Ehrlichia*, denominada provisionalmente *E. walkerii*, en *I. ricinus* recogidos de pacientes podría justificar algunos casos dudosos de EHM diagnosticados en Europa.

La EHM se describió en 1987 en EE.UU. Aunque en un principio se implicó a *E. canis* (agente productor de la ehrlichiosis monocítica canina) como la bacteria responsable (reacción serológica cruzada), en la actualidad se sabe que el agente causal es *E. chaffeensis*, denominada así por

Tabla 1. Especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* implicadas en patología humana

Especies de <i>Ehrlichia</i> y <i>Anaplasma</i>	Vector	Distribución geográfica
<i>E. canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mundial
<i>E. chaffeensis</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	Norteamérica
	<i>Dermacentor variabilis</i>	Centroamérica
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
		Norteamérica
		Norte de África
<i>E. ewingii</i>	<i>A. americanum</i>	Norteamérica
<i>E. sennetsu</i>	Desconocido	Japón
		Malasia

aislarse en Fort Chaffee (Arkansas). Desde entonces se han comunicado miles de casos de EHM en EE.UU. En ese mismo país, en 1994, se describió por primera vez la AH provocada por la actualmente denominada *A. phagocytophilum* y en 1999 se descubrió que *E. ewingii*, un patógeno reconocido como agente causal de ehrlichiosis granulocítica en perros, podía también causar infección en humanos con inmunodepresión. Tras estos hallazgos, se han descrito en EE.UU. más de mil casos de AH, lo que contrasta con los menos de 100 casos descritos en Europa (incluida España), desde su primera descripción en Eslovenia en 1997. En el momento de escribir estos procedimientos microbiológicos sólo podemos afirmar que *E. canis* es el causante de la ehrlichiosis canina. No obstante esta ehrlichia, ampliamente distribuida por todo el mundo, y vehiculada por la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) ha sido implicada como patógeno humano en Venezuela.

A pesar de que las dianas de *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum* son diferentes (monocitos y granulocitos respectivamente) ambas presentan un cuadro clínico superponible. No obstante al no existir datos sobre la presencia en Europa de otras ehrlichiosis humanas diferentes a la AH el presente documento se centrará en la descripción de ésta. En Europa no se ha detectado la presencia de *E. chaffeensis* ni en artrópodos ni en mamíferos (humanos incluidos). Los casos de EHM que se publicaron en Europa hace años, se basaron en reacciones serológicas cruzadas y en la actualidad no se aceptan.

El contacto con sangre de animales infectados, el empleo de hemoderivados (transfusiones) y la transmisión perinatal son vías excepcionales de adquisición de la enfermedad. La mayor incidencia de estas infecciones se produce en los meses en los que las diferentes especies de garrapatas implicadas en la transmisión de estas bacterias están más activas (primavera-verano y principio de otoño).

En Europa se han realizado diferentes estudios de prevalencia de la infección por *A. phagocytophilum* en humanos y garrapatas. En los mismos llama la atención la prevalencia tan alta que encontramos en la garrapata vector (hasta el 45%), y los pocos casos humanos que se diagnostican. A este respecto se ha apuntado que es posible que algunas variedades de *A. phagocytophilum*, como la variante AP-1 descrita inicialmente en EE.UU., y también detectada en España, en *I. ricinus* procedentes de La Rioja, no sean patógenas.

No se conoce con exactitud la fisiopatología de las ehrlichiosis/anaplasmosis. Al igual que en otras enfermedades transmitidas por garrapatas, las ehrlichias llegan a la sangre tras la picadura de una garrapata. Desde allí infectan a los leucocitos circulantes y a las células del sistema retículo-endotelial. Estos microorganismos penetran en el interior de las células por fagocitosis. Una vez en el interior es posible que inhiban la fusión fagosoma-lisosoma y retrasen la apoptosis celular, facilitando la multiplicación de las bacterias. Una característica de las diferentes especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* es que se aglomeran en el citoplasma formando unas inclusiones que se pueden observar al microscopio óptico,

denominadas mórulas. Estas mórulas se forman a los pocos días, y se pueden observar fundamentalmente en sangre periférica, pero también en médula ósea, sinusoides hepáticos y/o esplénicos, e incluso en las células del líquido céfalo-raquídeo (LCR). La afinidad de las diferentes especies de este tipo de bacterias por sus células diana, es la responsable de las citopenias observadas (leucopenia, trombopenia), llegando en ocasiones a provocar grados severos de inmunodepresión. Este hecho facilita la aparición ocasional de infecciones oportunistas.

Los principales determinantes antigénicos de las ehrlichias son las proteínas de la membrana de superficie. Si bien se cree que la infección confiere una protección duradera frente a nuevas infecciones, se han confirmado casos de reinfección por la misma especie de *Ehrlichia*. Asimismo existen datos de la posible persistencia de estas bacterias en el citoplasma de las células infectadas durante largos periodos de tiempo.

Las ehrlichiosis y anaplasmosis son infecciones sistémicas, por lo que provocan daño en diferentes órganos y sistemas, pudiéndose encontrar granulomas y megacariocitosis en médula ósea, necrosis focal hepática y la existencia de un infiltrado linfohistiocítico perivascular que afecta a hígado, meninges, cerebro, corazón, etc.

La AH granulocítica (AHG) es una enfermedad febril aguda en la que la mayoría de los pacientes recuerdan la picadura de una garrapata en los días/semanas previos. Se han comunicado más casos en varones que en mujeres. El periodo de incubación varía entre 5-21 días (media 11 días). La mayor parte de los casos europeos se han producido entre abril y octubre (época de actividad del vector) con un pico en julio. Los pacientes se presentan con fiebre de comienzo súbito (>38,5°C), malestar general, cefalea, mialgias y artralgias. La exploración física no muestra datos a destacar, salvo la presencia ocasional de conjuntivitis y adenopatías. Las organomegalias no son frecuentes. Además del cuadro pseudo-gripal pueden existir otras manifestaciones clínicas: respiratorias (tos); digestivas (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, anorexia) y neurológicas (meningitis). La presencia de exantema es más frecuente en los pacientes con EHM y muy rara en la AHG. Más de la mitad de los pacientes requieren hospitalización durante la enfermedad en las series americanas. En la AHG europea las manifestaciones clínicas parecen menos severas, si bien algunos casos de AHG se presentan como una neumonía atípica. Entre las complicaciones de estas infecciones se han descrito, entre otras, coagulación intravascular diseminada, distress respiratorio del adulto, neuropatías periféricas, parálisis facial, pancarditis y rabdomiolisis. La inmunodepresión (leucopenia) provocada en algunas ocasiones se acompaña de infecciones oportunistas (neumonía micótica), que pueden llevar a la muerte al paciente. En Norteamérica, entre el 0-5% de los pacientes con AHG fallecen, y la mayoría de las muertes se deben a infecciones oportunistas o

a enfermedades concomitantes, si bien estos aspectos no se describen en la literatura europea.

Aunque los hallazgos de laboratorio (hematológicos y bioquímicos) son inespecíficos, estos pueden ayudar al diagnóstico. Así la mayoría de los pacientes presentan en la fase aguda de la enfermedad leucopenia y trombopenia, además de elevación moderada de las transaminasas (AST, ALT), lactodeshidrogenasa (LDH), y proteína C reactiva. Estas alteraciones se suelen resolver en la AHG europea en unos 14 días del inicio del cuadro. En los pacientes con AHG que presentan signos meníngeos, el análisis del LCR suele ser normal, a diferencia de los pacientes con EHM en los que se observa pleocitosis linfocitaria, con aumento de proteínas, y mayor prevalencia de clínica neurológica. La glucorraquia suele encontrarse en los límites de la normalidad.

Por último, se debe tener en cuenta que dado que los vectores de estas bacterias pueden transmitir otras enfermedades como la borreliosis de Lyme, encefalitis centroeuropea o las babesiosis, se puede dar el caso de que coexistan más de una enfermedad en el paciente que ha sido picado por garrapatas, y observarse manifestaciones clínicas de más de una de ellas.

1.3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Para el aislamiento de *A. phagocytophilum* se debe obtener sangre durante la fase aguda de la enfermedad, que es cuando existe la mayor concentración de leucocitos infectados en sangre periférica. La sangre se debe extraer preferiblemente en tubos de EDTA, y preservarse a temperatura ambiente no más de 48 horas o congelada a -20°C antes de la inoculación en los medios de cultivo. La sangre infectada con *A. phagocytophilum* recogida en tubos de heparina también se ha mostrado útil para el cultivo durante 10 días a temperatura ambiente y hasta 13 días conservada a 4°C . No obstante se recomienda no utilizar estos tubos ya que comprometen su posterior utilización para la posible amplificación del genoma mediante técnicas de PCR. En el caso de afectación neurológica, también se debe recoger LCR.

1.4. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Todas las muestras deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente o inadecuada. En todos estos casos se contactará con el médico solicitante para solicitar una nueva muestra.

1.5. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

En la tabla 2 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología, indicando aspectos generales sobre la recogida, tiempo y temperatura de transporte y conservación.

Se debe tener en cuenta que, habitualmente, la carga microbiana en este tipo de infecciones es menor que en el caso de otras bacterias. Esto obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo. Las muestras inaceptables no deben procesarse y se debe informar inmediatamente al médico responsable del paciente. Los consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico (aspecto, color, coágulos, etc.), así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.
4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible, más aún en el caso de que se persiga el aislamiento del agente, garantizando de esta forma la viabilidad.

1.6. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

Observación de mórulas. Para la observación de leucocitos infectados lo mejor es preparar las extensiones de sangre periférica inmediatamente después de la extracción de sangre. Deben secarse al aire y conservarse a temperatura ambiente para su observación.

Cultivo. Se realiza en muy pocos centros, recomendándose para la realización del mismo un laboratorio con un nivel mínimo de seguridad de tipo 3. La línea celular más empleada para el cultivo de *A. phagocytophilum* es la de células promielocíticas leucémicas HL-60. La sangre fresca (100 μL), o 5 mL de la capa leucocitaria de sangre en EDTA congelada previamente a -20°C se debe inocular en frascos de 25- cm^2 con células HL-60 con una densidad de 2×10^5 células. La infección se puede comprobar mediante tinciones de Giemsa, siendo generalmente visibles las mórulas a los 3-7 días de la inoculación, o mediante PCR.

Serología. La serología es la técnica de laboratorio más utilizada para el diagnóstico microbiológico de estas infecciones. Dentro de las diferentes técnicas serológicas, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la más empleada. En la actualidad disponemos de diferentes antígenos para el diagnóstico de la AH, que bien son preparados con sustrato de células infectadas o con antígenos puros.

Tabla 2. Muestras necesarias para el diagnóstico de anaplasmosis humana.

MUESTRA	RECOGIDA	TRANSPORTE Tiempo y temperatura	CONSERVACIÓN Tiempo y temperatura	PRUEBA DIAGNÓSTICA	NOTA
Suero	Recoger en tubo de serología	≤24 h, 2-8°C	+24h, -20°C	IFI ¹	
Sangre con EDTA	Recoger en tubo con EDTA	≤ 48 h, TA +48h, - 20°C	+48h, - 20°C (no varias descongelaciones)	PCR ²	
Sangre citratada	Recoger en tubo con citrato	≤ 48 h, TA +48h, - 20°C	+48h, - 20°C (no varias descongelaciones)	PCR ²	
Sangre heparinizada	Recoger en tubo con heparina	≤ 24h, TA + 24h, -80°C	+24h, -80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo ³	La heparina ⁴ puede inhibir la PCR

¹Inmunofluorescencia indirecta. ²Reacción en cadena de la polimerasa. ³Muy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de bioseguridad 3. ⁴Evitar el uso de heparina para muestras en las que se vaya a realizar diagnóstico molecular, puesto que este anticoagulante puede inhibir la PCR.
Abreviatura: TA: Temperatura ambiente

Su mayor limitación es la existencia de reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*. No obstante, al no existir en Europa ninguna evidencia que haya demostrado la presencia de otras ehrlichiosis humanas diferentes a la de la AH, ante un cuadro clínico sugestivo, ante una serología positiva se debe sospechar en una AH. También se han descrito reacciones cruzadas entre estas bacterias y otros *Rickettsiales*, como *R. rickettsii*, y *R. typhi*. En nuestra experiencia también se pueden producir reacciones cruzadas en la mononucleosis infecciosa, en la fiebre Q, y en la infección por *R. slovaca*. Su limitación es la falta de sensibilidad en fases agudas. Se debe extraer un segundo suero entre 14 y 21 días para observar seroconversión.

Detección molecular. Se realiza mediante métodos basados en la PCR. No están estandarizados y pueden mostrar resultados discrepantes. Se ha logrado la detección de ADN de *A. phagocytophilum* de sangre y de suero en la fase aguda. En la actualidad se dispone de múltiples dianas, habiéndose demostrado como más sensibles los fragmentos los que amplifican un fragmento del gen 16S ARNr. También se utilizan amplificaciones del gen *epank* o los fragmentos homólogos del gen *msp2*.

1.7. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico de la anaplasmosis/ehrlichiosis requiere un alto índice de sospecha. Ante los hallazgos de laboratorio (trombopenia, leucopenia y aumento de las transaminasas) y los antecedentes epidemiológicos, se debe sospechar esta posibilidad. Estas infecciones se han de tener en cuenta en aquellos individuos previamente sanos que presentan fiebre tras realizar actividades al aire libre y en los pacientes que refieren antecedentes de picadura de garrapata y que no responden al tratamiento con betalactámicos o macrólidos, especialmente en áreas endémicas para la borreliosis de Lyme. La normalidad

de los parámetros analíticos no descarta la enfermedad. En la Tabla 3, se exponen los criterios del ESCAR (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Coxiella, Rickettsia, Anaplasma and Bartonella*) para el diagnóstico de la AH. Existen también criterios de los CDC para el diagnóstico de la EHM y la AH.

1.8. PROFILAXIS

Las ehrlichiosis y anaplasmosis se previenen evitando la picadura de las garrapatas. A este respecto, llevar una indumentaria adecuada en los lugares boscosos y con hierba alta, el uso de repelentes, y la revisión del cuerpo tras las excursiones en búsqueda de estos artrópodos y su correcta extracción mediante pinzas constituyen las medidas de profilaxis primaria. Por el momento no existen vacunas, y no hay evidencia de que la profilaxis antibiótica tras la picadura de garrapatas sea coste-efectiva.

1.9. TRATAMIENTO

Dado que la confirmación microbiológica puede tardar varias semanas o no producirse, ante la sospecha clínica, los autores de este procedimiento opinan que se debe administrar tratamiento de forma empírica. Son muchos los antibióticos que han demostrado ser eficaces, y al igual que en las rickettsiosis, la doxiciclina es el tratamiento de elección incluidos los niños (100 mg cada 12 horas durante 7 a 14 días y en niños ajustar según peso). Las quinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino) y la rifampicina son posibles alternativas terapéuticas. La respuesta al tratamiento es buena y los síntomas se resuelven 24-48 horas después de iniciado el tratamiento. En ausencia de respuesta al tratamiento se han de descartar otras posibilidades diagnósticas o coinfección por otros agentes.

Tabla 3. Propuestas para la definición de casos de AHG del ESCAR (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Coxiella, Rickettsia, Anaplasma and Bartonella*).

Anaplasmosis humana confirmada

1. Fiebre con antecedente de exposición o picadura de garrapata, y
2. Demostración de infección por *Anaplasma phagocytophilum* por seroconversión o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos^a, o
3. Resultado de PCR positivo con posterior secuenciación de los amplicones demostrando ADN específico de *Anaplasma* en sangre, o
4. Aislamiento de *A. phagocytophilum* en cultivo de sangre

Probable anaplasmosis humana

1. Fiebre con antecedente de exposición o picadura de garrapata, y
2. Presencia de un título estable de anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* en los sueros agudo y convaleciente si el título es 4 veces el punto de corte^a, o
3. Resultado de PCR positivo sin posterior secuenciación^b, o
4. Presencia de mórulas intracitoplasmáticas en frotis sanguíneo

^a Por ensayos de inmunofluorescencia, usando tanto antígeno intracelular como purificado, en laboratorio de referencia o con el sistema comercializado de MRL Diagnostics (Cypress, CA, USA). ^b Usando los cebadores específicos de especie citados en la tabla 3.

2. INFECCIÓN POR *BARTONELLA* SPP.

2.1. INTRODUCCIÓN

Hasta 1993 *Bartonella bacilliformis*, causante de la enfermedad de Carrion, era la única especie de *Bartonella* conocida. Desde entonces el número de especies de *Bartonella* identificadas se ha incrementado considerablemente. De las 21 especies de *Bartonella* descritas hasta la actualidad solamente 10 son reconocidas como patógenos humanos. Las más frecuentes son *B. bacilliformis*, *B. quintana* y *B. henselae*. Otras especies de *Bartonella* implicadas en patología humana son *B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. washoensis*, *B. grahamii*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* y *B. alsatica*. Estos microorganismos están directamente implicados en algunas patologías como la enfermedad por arañazo de gato (EAG), angiomas bacilares, peliosis hepática, bacteriemia, endocarditis, osteomielitis, uveítis y trastornos neurológicos.

Desde el punto de vista microbiológico las bartonellas son pequeños bacilos gramnegativos, polimorfos, delgados, cortos y ligeramente curvados (muy parecidos a *Helicobacter* o *Haemophilus* e indistinguibles al microscopio del género *Afpia*). Su longitud oscila entre 1-1,2 µm y su diámetro 0,5-0,8 µm.

Las diferentes especies de *Bartonella* presentan una gran diversidad de reservorios y de vectores de transmisión. El factor que determina la distribución geográfica de las diferentes especies es el tipo de vector que precisan. Así *B. bacilliformis* se encuentra exclusivamente en algunos países de América del Sur (Perú, Colombia, Bolivia, Chile y Guatemala), otras como *B. quintana* o *B. henselae* son totalmente cosmopolitas. En el caso de *B. henselae* el reservorio fundamental es el gato doméstico y las pulgas el vector de transmisión; para *B. quintana* el vector de transmisión son los piojos y su único reservorio es el hombre, el resto de bartonellas presentan diversos vectores y reservorios.

2.2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

2.2.1. Fiebre de Oroya (fase aguda) y verruga peruana (fase crónica). Esta enfermedad es conocida como enfermedad de Carrion y es endémica en Sudamérica, donde se encuentra su vector, la mosca de la arena (*Lutzomyia verrucarum*). No se conocen otros reservorios diferentes al hombre. La enfermedad se manifiesta con fiebre, malestar, palidez, anorexia, debilidad y anemia hemolítica aguda acompañada de septicemia, como consecuencia de la invasión masiva de los hematíes. Sin tratamiento su pronóstico es grave (mortalidad del 40-85%). La fase crónica (verruga peruana) se manifiesta unos meses más tarde, y se manifiesta como unas lesiones cutáneas sobreelevadas, pseudotumorales, angiomasas y que sangran con facilidad al contacto.

2.2.2. Enfermedad por arañazo de gato (EAG). Se caracteriza por la aparición de adenopatías regionales después de haber sufrido un arañazo o mordedura de gato. Es una infección de distribución mundial, presenta estacionalidad y tiene una

incidencia estable, sin brotes epidémicos. Puede afectar a personas de cualquier edad, pero más del 80% de los casos se da en pacientes menores de 21 años. Al inicio de la infección el 60-90% de los pacientes presenta una pápula o pústula en la zona de inoculación y posteriormente (entre 1-3 semanas) aparece la afección ganglionar en el área de drenaje del punto de inoculación. La mayoría de adenopatías son axilares, cervicales o inguinales. En pocos casos existen manifestaciones atípicas (5-25%) siendo las más frecuentes la afección oculo-glandular (síndrome de Parinaud), junto con otras manifestaciones oftalmológicas y la encefalitis. Algunos pacientes en edad pediátrica pueden presentar asociados a la EAG cuadros de encefalopatías; su recuperación es completa en la mayoría de los casos.

2.2.3. Fiebre de las trincheras. También llamada también fiebre de Volinia o fiebre de los 5 días. *B. quintana* es el agente patógeno responsable de la infección. El principal reservorio es el ser humano y el vector transmisor es el piojo de la ropa (*Pediculus corporis*) que infecta al hombre a través de la picadura. Tras una incubación de 12-25 días, los pacientes presentan fiebre, escalofríos, cefalea, dolor pretibial y una profunda postración.

2.2.4. Angiomas bacilares (AB) y peliosis hepática. En 1983 se describieron las primeras lesiones subcutáneas asociadas a pacientes con inmunodeficiencias. Se trata de una infección cutánea caracterizada por pequeñas pápulas eritematosas, de color rojo púrpura que pueden crecer a nódulos dérmicos, subcutáneos o placas induradas e hiperpigmentadas debido a una proliferación vascular. Se descubrió inicialmente en pacientes inmunodeprimidos por el VIH y habitualmente con CD4+ <100. Las especies asociadas a AB son *B. henselae* y *B. quintana*.

La peliosis hepática es una lesión predominante de órganos sólidos con elementos reticuloendoteliales. El hígado es el principal órgano afectado aunque puede afectar al bazo, ganglios linfáticos e incluso la médula ósea. *B. henselae* es la única especie implicada en este cuadro clínico.

2.2.5. Endocarditis. Las endocarditis con cultivo negativo (ECN) suponen entre el 2,5 y el 31% de todas las endocarditis. Descartado el tratamiento antibiótico, las causas que pueden favorecer la obtención de cultivos negativos serían el crecimiento lento de algunas bacterias y la dificultad de algunos microorganismos para crecer en medios convencionales. Las mejoras en las técnicas de detección por PCR y las modificaciones en las técnicas de cultivo han favorecido el diagnóstico de las endocarditis. En estos momentos *Bartonella* spp. es responsable del 1-17% de todos los casos. Las características clínicas son similares al resto de endocarditis, suele producirse en pacientes sin valvulopatía previa y en un 60% de los casos existe contacto con gatos.

2.3. DIAGNOSTICO

2.3.1. Métodos directos. La biopsia, su examen histológico y la demostración de bartonellas es uno de los métodos diagnósticos más rápido y rentable en la actualidad.

2.3.1.1. Tipo de muestra. Las muestras que se utilizan para el diagnóstico directo son biopsias de ganglios, piel, válvulas y en algunos casos puede utilizarse la sangre.

2.3.1.2. Transporte y conservación de la muestra. Las muestras deben recogerse de manera aséptica por personal cualificado y enviarse rápidamente al laboratorio para su posterior manipulación. Las biopsias se conservan en formaldehído, mientras que las muestras de sangre se inoculan directamente en botellas de hemocultivo. Las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente hasta su recepción en el laboratorio.

2.3.1.3. Tinciones. La tinción de impregnación argéntica de Warthin-Starry es la más utilizada. En ella se pueden observar masas de bacterias pleomórficas teñidas de oscuro casi negras. Otras tinciones útiles son las de hematoxilina y eosina y la de naranja de acridina. Las muestras son parafinadas en bloques y cortadas en láminas de 0,4-0,5 mm de grosor para su posterior tinción.

En el examen histológico puede observarse la proliferación vascular lobular de pequeños vasos con grandes células endoteliales (epiteloides) que protruyen dentro de los capilares recientemente formados, pudiendo obstruir su luz y presentar atipias nucleares que a su vez están rodeadas por un infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares, algunos linfocitos y algunas zonas focales de necrosis, así como grumos de material granular que son cúmulos de bacilos de *B. henselae* y que se disponen habitualmente de forma próxima a la luz de los vasos. En la peliosis hepática existe una proliferación importante de capilares sinusoidales, formación de grandes lagos vasculares en un estroma mixoide y con células inflamatorias. También pueden observarse bacterias en el estroma. De manera excepcional se pueden observar granulomas necrotizantes.

Si en lugar de biopsia, el microorganismo se aísla de un cultivo de sangre positivo, la tinción necesita de un proceso previo de concentración y lisis de la sangre. Para realizar la tinción con naranja de acridina (0,01%) se deben poner unas gotas de la muestra de sangre lisada en un portaobjetos, fijar durante 2 minutos con metanol y tefir. Si la muestra es positiva se observará la presencia de bacilos pequeños y pleomórficos de color naranja (visualización con microscopio de fluorescencia).

2.3.1.4. Interpretación de resultados. Las técnicas de observación directa proporcionan un resultado presuntivo o compatible de infección por *Bartonella* spp. Estas han de ir acompañadas de otros métodos diagnósticos (serología, cultivo, PCR), para el diagnóstico definitivo de la infección.

2.3.2. Cultivo microbiológico. El aislamiento de *Bartonella* spp. en muestras humanas es difícil y requiere de procesos especiales que no se dan en

laboratorios de microbiología de manera rutinaria. Por sus requerimientos nutricionales son considerados microorganismos exigentes o fastidiosos, y debido a esto siempre hay que tener en cuenta que un hemocultivo o cultivo de biopsia negativo después de un largo periodo de incubación no excluye en absoluto la sospecha de infección por *Bartonella*.

2.3.2.1. Tipos de muestras. Las muestras más utilizadas para el cultivo microbiológico son las biopsias (ganglios linfáticos, válvulas cardíacas, piel) y sangre (pacientes inmunodeprimidos o con sospecha de endocarditis).

2.3.2.2. Transporte y conservación. Las biopsias deberán obtenerse de manera aséptica para poder evitar posibles contaminaciones y se transportarán al laboratorio con agua destilada lo más rápidamente posible. El cultivo se realizará inmediatamente o se conservará a -80°C para un proceso posterior. Los cultivos de sangre se inoculan directamente en una botella de hemocultivo, para ser incubados en un sistema automático durante al menos 21 días. También se puede cultivar la sangre directamente en medios sólidos, siempre que se realice el proceso de lisis de los hematíes.

2.3.2.3. Procesamiento y medios de cultivo. Las biopsias deberán ser maceradas en un mortero de manera estéril para poder minimizar el riesgo de contaminación bacteriana. El medio más utilizado para el crecimiento de *Bartonella* spp. es el agar sangre con un 5% de sangre de cordero o agar chocolate (medios comercializados), aunque existen trabajos que presentan mejores rendimientos de crecimiento si se utiliza sangre fresca de conejo. También pueden utilizarse medios líquidos suplementados con hemina e incluso cultivo celular mediante la técnica de *shell vial* (las muestras de sangre heparinizada o tejido se diluyen en medio líquido, MEM, RMPI con suero bovino fetal, se someten a un proceso de centrifugación sobre capas de líneas celulares y se incuban durante un periodo de 15-30 días). Estos cultivos se revelan mediante una tinción de Jiménez. El sobrenadante se guarda para poder inocular en posteriores cultivos celulares en el caso que se observe la presencia de bartonellas o para poder realizar una PCR.

La detección de *Bartonella* spp. en sangre mediante métodos automatizados es difícil, posiblemente debido a la baja o inexistente producción de CO₂; no obstante se han obtenido algunos aislados de *B. henselae* de pacientes inmunodeprimidos. En estos casos se recomienda, tras 21 días de incubación de los frascos de hemocultivos, una siembra en un medio sólido. Cuando el hemocultivo es dado como negativo por el incubador automático se debe proceder a la concentración de la muestra y a su siembra en una placa de agar sangre durante un periodo no inferior a 2 meses. Si la muestra de sangre no se ha procesado en una botella de hemocultivo, se puede realizar el cultivo en medio sólido, siempre procediendo a una lisis previa de los hematíes.

Existen 2 métodos actualmente aceptados, el primero es someter la sangre a un proceso de congelación de -80°C durante 24 horas y una vez lisa sembrar. El otro sistema es utilizar el Isolator™ blood-lysis tube que lisa directamente los hematíes.

2.3.2.4. Condiciones de incubación. El crecimiento del género *Bartonella* (excepto *B. bacilliformis*) es muy lento. Las muestras deberán incubarse a $35-37^{\circ}\text{C}$ con un 5% de CO_2 (excepto *B. bacilliformis* que solamente crece a $28-30^{\circ}\text{C}$). El tiempo mínimo de incubación variará dependiendo del tipo de cultivo de que se trate. Si es un cultivo primario o una muestra directa de paciente se deberá incubar durante un periodo mínimo de 2 meses; si por el contrario se trata de subcultivos de *Bartonella* (previamente aislados), son necesarios solamente de 3-10 días. Aumentar el tiempo incubación de las muestras en medios húmedos incrementa el riesgo de contaminación por hongos y por bacterias de crecimiento rápido. Este problema se minimiza adicionando antimicóticos como anfotericina B al cultivo o más fácilmente mediante el cierre de la placa de cultivo con Parafilm después de transcurridas las primeras 24 horas de incubación.

2.3.2.5. Criterios para interpretación de resultados. Se considera positivo el cultivo para *Bartonella* spp. cuando se observan en el medio pequeñas colonias, de color blanco-amarillento y aspecto rugoso, siempre muy adheridas al medio, incrustadas en la superficie y difíciles de arrastrar con un asa de siembra. Tienen un tamaño pequeño que oscila entre los $0,3-2,0\ \mu\text{m}$. El primer subcultivo puede presentar dificultades en su crecimiento, pero después de múltiples resiembras o subcultivos crecen con facilidad (3-10 días). Las colonias de *B. henselae* y *B. quintana* de un primer aislamiento presentan una morfología muy heterogénea, formas irregulares, redondeadas y rugosas, después las colonias de los subcultivos tienen un aspecto más brillante y mucho menos adheridas al medio.

2.3.2.5.1. Identificación del microorganismo.

Identificar las diferentes especies del género *Bartonella* en el laboratorio, resulta muy difícil, ya que fenotípicamente y genotípicamente son muy similares. La tinción de Gram confirmará que se trata de bacilos Gram negativos. Todas las especies son oxidasa, ureasa, nitrato reductasa negativas y todas las bartonellas, excepto *B. bacilliformis*, son catalasa negativa. *Bartonella* spp. es un microorganismo bioquímicamente inerte, no utiliza azúcares (fructosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, ni sucrosa) que se encuentran en la mayoría de las pruebas bioquímicas de identificación comercializadas. Además sus bases de datos son a menudo incompletas y no tienen la suficiente información sobre este género. Los resultados de identificación de especies de *Bartonella* obtenidos con estos sistemas no son ni concluyentes, ni fiables, ni aceptables. Tras el análisis de diferentes estudios comparativos entre los diferentes métodos comercializados (Rapid ANA II System, MicroScan

Rapid, Rapid ID 32 A) la única conclusión aceptada es que solamente se pueden utilizar para una identificación a nivel de género.

2.3.2.5.2. Subcultivos y conservación de las cepas.

Los subcultivos de estas bacterias no presentan ningún problema, con un medio enriquecido con sangre de cordero, incubadas a una temperatura, humedad y concentración de CO_2 adecuadas se obtiene un buen crecimiento de la cepa. Estas pueden conservarse con un medio de congelación rico en nutrientes, tipo caldo brucella con un 10% de glicerol, y congeladas a -80°C con el fin de garantizar un periodo más largo de supervivencia.

2.3.3. Serología

2.3.3.1. Utilidad clínica. La detección de anticuerpos específicos frente a *Bartonella* spp. para el diagnóstico de esta infección evita los inconvenientes del largo periodo de incubación que precisa el cultivo bacteriológico y la complejidad de las técnicas de biología molecular. Se han utilizado diferentes técnicas serológicas: la inmunoperoxidasa, enzimoimmunoensayo (EIA) e inmunofluorescencia (IFI). Esta última técnica, es la más utilizada por su sensibilidad, especificidad y se considera la técnica de referencia. Está comercializada, y en la actualidad se dispone de IFI para la detección de *B. henselae* y *B. quintana*. Se pueden detectar inmunoglobulinas IgG (utilizadas para el diagnóstico de la infección y para estudios de seroprevalencia) e IgM (anticuerpos específicos de la infección aguda).

2.3.3.2. Muestra, transporte y conservación. La muestra utilizada para realizar la detección de anticuerpos es el suero, que debe congelarse a -80°C si no se va a realizar la técnica tras la recepción de la muestra.

2.3.3.3. Procesamiento de la muestra. La técnica de IFI utiliza como antígeno bacterias de *B. henselae* y *B. quintana*. Para la detección de IgG se aconseja utilizar bacterias cultivadas en células Vero y fijadas en un portaobjetos, mientras que para la determinación de IgM se utiliza una suspensión bacteriana procedente de cultivos en medio sólidos. Se realizará la técnica siempre teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante.

2.3.3.4. Criterios de interpretación. El título del suero es la dilución más alta que presenta reacción positiva. Las muestras obtenidas al inicio de la infección pueden ser negativas, por este motivo siempre que se sospecha una infección por *Bartonella* spp. es importante estudiar dos muestras recogidas en un intervalo de 15-21 días en paralelo (fase aguda y convaleciente) y observar un incremento o seroconversión de los títulos de anticuerpos (aumento de dos títulos). Se consideran positivos los títulos $>1/64$.

Si existe sospecha de endocarditis y el cultivo de sangre es negativo, se deben tener en cuenta microorganismos poco habituales como *Coxiella burnetii*. En el caso de *Bartonella* spp. títulos de IgG ≥ 800 por IFI son altamente predictivos de endocarditis.

2.3.4. Métodos moleculares. Las técnicas moleculares son útiles para la identificación de cepas aisladas, pero su papel es mucho más relevante cuando se trata de realizar un diagnóstico directo de la enfermedad en muestras biológicas.

2.3.4.1. Identificación de cepas. Para identificar la cepa aislada primero se debe disponer de un cultivo puro de este microorganismo, posteriormente debe realizarse una extracción de ADN, existen en el mercado distintos métodos comercializados, QIAamp® ADN Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany), y kit de extracción de Ecogen entre otros. Una vez realizada la extracción el ADN podrá conservarse en nevera para una posterior PCR o podrá congelarse a -80°C donde se mantiene estable durante un largo periodo de tiempo. Existen en la actualidad numerosas secuencias utilizadas para amplificar el género *Bartonella* y para poder diferenciar especies.

Para la determinación del género *Bartonella* una de las secuencias más útiles es BhCS.781p y BhCS.1137n, que corresponden a un fragmento del gen de la citrato sintasa (*glta*) de *Bartonella* spp. Para la diferenciación de las especies existe aún más variedad de secuencias, da buen resultado utilizar los primers complementarios de la región intergénica del 16S-23S ARNr. Una vez realizada la PCR si es positiva para el género *Bartonella*, se puede deducir la especie mediante su visualización en el gel de agarosa y confirmar el resultado con la secuenciación.

2.3.4.2. Detección directa por PCR de muestras biológicas. Las técnicas moleculares son muy útiles en el diagnóstico directo de la infección por *Bartonella*. Se pueden aplicar a biopsias o tejidos sólidos y también se puede realizar amplificación de ADN en sangre con EDTA. En los dos casos se precisa un proceso previo de extracción de ADN, que se realiza con sistemas comercializados. El proceso de amplificación es el mismo que el comentado anteriormente para la identificación de cepas.

2.4. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

Clásicamente la EAG no se trataba con antibióticos, sino que se utilizaban analgésicos para minimizar el dolor y se realizaba un seguimiento de los síntomas clínicos del paciente. Si precisa antibioterapia se suele tratar con azitromicina (500 mg el primer día y 250 mg los 4 restantes). Para las formas más graves es útil la asociación de doxiciclina (200 mg/día) y rifampicina (600 mg/día). La angiomatosis bacilar suele tratarse con eritromicina (500 mg/6 horas) durante 3 meses o doxiciclina (200 mg/día) durante tres meses. En el caso de la endocarditis se asocia con gentamicina (3 mg/kg/día) durante 14 días y azitromicina (250 mg/día) o doxiciclina (100 mg/día) durante 4-6 meses. En los casos de fiebre de las trincheras y bacteriemia, los fármacos recomendados son doxiciclina 200 mg/día o azitromicina 500 mg/día durante 4-semanas. La fiebre de Oroya se trata con cloranfenicol o cefalexina durante 10 días y la verruga peruana con rifampicina 300 mg/12 h o ciprofloxacino 500 mg/día durante 10 días.

Tan importante es realizar un buen tratamiento antibiótico de la infección como intentar evitar su contagio. La profilaxis depende directamente de la erradicación de vectores transmisores de la infección (pulgas de gato y piojos), así como la administración de vacunas a animales domésticos (perros y gatos) para así poder disminuir la prevalencia de la infección.

3. INFECCIONES POR RICKETTSIA SPP.

3.1. INTRODUCCIÓN

El género *Rickettsia* está constituido por especies de pequeños cocobacilos Gram negativos pleomórficos, inmóviles y aerobios, que se comportan como patógenos intracelulares obligados y están relacionados serológicamente. Se tiñen razonablemente bien con los métodos de Giemsa, Castañeda y Giménez y débilmente con la tinción de Gram.

Este grupo de bacterias representan una de las mayores ironías biológicas conocidas hasta ahora. Por una parte, han sido causantes desde la antigüedad, y aún en nuestros días, del tifus epidémico, una de las plagas más devastadoras que ha sufrido la humanidad; por otro lado, estudios filogenéticos indican que un antecesor evolutivo de una rickettsia dio lugar a uno de los sucesos más importantes en la evolución de los eucariotas: el origen de las mitocondrias.

Las rickettsiosis constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución geográfica heterogénea cuya severidad varía desde formas benignas y autolimitadas a infecciones fulminantes de elevada mortalidad. La mayoría de los casos se adquieren por picadura de garrapatas, piojos o pulgas que están infectadas por el microorganismo. El hombre es un huésped accidental en el ciclo biológico de las rickettsias en el que intervienen diversos mamíferos (reservorios) y artrópodos que no sufren, en general, daño por la presencia de la bacteria y actúan como reservorios y/o vectores del microorganismo. Diversos mamíferos, esencialmente pequeños roedores, ganado y perros, contribuyen a perpetuar la infección y cerrar el ciclo biológico de la bacteria. Un hecho de especial interés en relación a la epidemiología de las rickettsiosis reside en que la distribución de una especie determinada, en general, coincide con la distribución de la garrapata vectora. Sin embargo, las bases de la asociación entre determinadas especies de rickettsia y de garrapatas no se conocen en detalle. Así, mientras que la distribución de la fiebre botonosa (FB) producida principalmente por *R. conorii*, se asocia a la distribución de *Rhipicephalus sanguineus*, *R. rickettsi*, causante de la fiebre de las Montañas Rocosas, está asociada a ixódidos de distintos géneros.

Hasta el año 1991 sólo se conocían cinco enfermedades rickettsiales. Desde entonces, gracias al desarrollo de los métodos de cultivo y de las técnicas de biología molecular, se han descrito otras muchas ocasionadas por especies aisladas en garrapatas y consideradas hasta entonces no

patógenas para el hombre. De hecho, entre 1984 y el 2005 se han identificado 11 nuevas especies o subespecies de rickettsias consideradas por muchos autores como agentes emergentes. Así, entre los ejemplos más ilustrativos destacan *R. parkeri*, considerada no patógena durante más de 60 años (en 2004 fue aislada a partir de la escara de un paciente), y el caso de *R. massiliae*, cuya patogenidad, se ha demostrado 13 años después de su primer aislamiento de garrapatas. Por ello, en la actualidad la mayoría de los investigadores consideran potencialmente patógena a toda especie que se encuentra en un artrópodo capaz de picar a personas. En cualquier caso, el impacto de estas enfermedades continúa siendo de gran interés debido a su alta prevalencia en algunas áreas y también por su considerable mortalidad. Además, su importancia ha aumentado recientemente debido a su potencial utilización como agresivos biológicos.

3.2. CLASIFICACIÓN Y CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Los principales síntomas de una rickettsiosis aparecen entre los 6-10 días después de la picadura y se caracterizan por cefalea, erupciones máculo-papulares, dolores musculares, linfadenopatía local y una o varias escaras en el punto de inoculación. A partir del sitio de entrada del agente, la infección se extiende por la circulación venosa invadiendo el endotelio de capilares, venas y arterias donde se multiplica y produce una vasculitis más o menos generalizada. Si bien los principales signos clínicos varían dependiendo de la especie implicada, los daños tienen un mismo origen y derivan de la vasculitis por la multiplicación bacteriana en las células endoteliales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, además de la cepa causante de la infección y del vector, puede influir el estado inmunitario del paciente. La lesión vascular provoca un aumento de la permeabilidad capilar que favorece la extravasación de líquido intravascular (edema) pudiendo causar hipovolemia e hipotensión. En los casos más severos las rickettsiosis suelen ir acompañadas de edema pulmonar, neumonía intersticial y erupción hemorrágica. También se pueden producir miopericarditis, meningitis linfocitaria y afectación hepática y gastrointestinal. Las alteraciones del sistema nervioso central suelen ser relativamente frecuentes pudiendo provocar distintos cuadros clínicos como ataxia, afasia y hemiplejía. Algunas de estas alteraciones derivan en importantes secuelas como sordera, pérdida de visión y paraplejía, entre otros defectos neurológicos.

Las rickettsias se clasifican en dos grupos atendiendo a las bases clínicas y a los agentes etiológicos responsables: el grupo de las fiebres manchadas y el de las fiebres tíficas. Las especies de ambos grupos presentan una distribución diferente en función del área geográfica y del tipo de hospedador y vector. Así, en América, la especie más frecuente del grupo de las fiebres manchadas es *R. rickettsii*, mientras que en la cuenca mediterránea es *R. conorii*. A continuación se

detallan las especies más relevantes desde el punto de vista clínico-epidemiológico.

3.2.1. Grupo de las fiebres manchadas (GFM). Las rickettsias pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas muestran una distribución mundial. La mayoría se transmiten por garrapatas y están muy relacionadas serológicamente. A continuación se tratará sobre las especies más interesantes en nuestro medio bien por el cuadro clínico que producen, aumento reciente de su área de distribución y/o características epidemiológicas.

R. conorii* subespecie *conorii

La rickettsiosis más frecuente en nuestra área es la fiebre botonosa (FB), también llamada fiebre exantemática mediterránea cuyo agente causal es *R. conorii*. La enfermedad fue descrita por primera vez en Túnez en 1910, aunque hasta 1932 no se conoció el papel de *R. sanguineus* como vector. La distribución de la FB abarca el norte de África y el sureste de Europa, aunque se han descrito casos en el norte y centro de Europa y en Turquía. Un dato de interés epidemiológico reside en que los casos suelen concentrarse en primavera y verano, correspondiendo al periodo de máxima actividad del vector. Tradicionalmente, *R. conorii* se considera menos patógena que *R. rickettsii*, aunque recientemente se ha constatado que las formas severas de la fiebre botonosa alcanzan a un 6% de los pacientes, con una tasa de mortalidad del 2,5%. En general, la aparición de los síntomas tiene lugar tras un periodo de 6 días de incubación. Los pacientes muestran fiebre alta, exantema y una escara en el punto de inoculación. En los casos severos se puede observar erupción petequeal y problemas neurológicos, renales y cardíacos.

Actualmente se incluyen dentro del taxón de *R. conorii* subespecie *conorii* tres estirpes: la cepa Seven o Malish, Kenia y Marroquí. Recientemente, el desarrollo de métodos de genotipado está permitiendo caracterizar la bacteria en profundidad lo que ha llevado a proponer la definición de las subespecies que estaban agrupadas en el mismo taxón: *R. conorii* subespecie *conorii*, *R. conorii* subespecie *israelensis* y *R. conorii* subespecie *caspia*.

R. conorii* subespecie *israelensis

Los primeros casos se comunicaron a mediados del siglo pasado en Palestina y fueron aumentando en paralelo al desarrollo de nuevos asentamientos rurales. El agente causal se aisló, por primera vez en 1971 de un paciente y de ejemplares de *R. sanguineus* que parasitaban perros de pacientes. Primeramente se observó que el agente responsable presentaba diferencias por inmunofluorescencia con otros miembros del grupo de las fiebres manchadas. En los últimos años se ha aislado en pacientes en Portugal y también se ha detectado de garrapatas en Italia, lo que parece indicar que su distribución es más amplia de lo que en un principio se pensaba. Por otra parte, algunos estudios indican que la prevalencia de esta enfermedad está en aumento. Recientemente se han realizado estudios

moleculares que evidencian que los aislados israelíes son muy homogéneos entre sí y diferentes de las cepas Malish y Marroquí de *R. conorii*. Todo ello ha llevado a proponer la clasificación de este agente como *R. conorii* subespecie *israelensis*. A diferencia de la FB, en el llamado tifus exantemático israelí no aparece escara en el punto de la inoculación sino una pápula rosácea, aunque sólo en el 7% de los casos. El periodo de incubación es de unos 7-8 días y los síntomas observados en todos los pacientes son fiebre y exantema, aunque pueden aparecer también artralgias, mialgias, cefalea y vómitos. Se ha observado esplenomegalia y hepatomegalia en el 30-35% de los casos. En niños y adultos con deficiencia en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se han descrito casos fatales y formas severas de la infección.

R. rickettsii

Es el agente causal de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. En esta enfermedad Ricketts describió en 1909 los microorganismos que luego llevarían el nombre de *Rickettsia* en su honor. Genética e inmunológicamente, *R. rickettsii* muestra una estrecha relación con otros miembros del GFM. La epidemiología de la enfermedad está relacionada con la garrapata que infecta que actúa, al mismo tiempo, como reservorio y vector. Diferentes especies de ixódidos transmiten la enfermedad en distintas áreas geográficas: *Dermacentor variabilis* y *D. andersonii* en Estados Unidos, *R. sanguineus* en México y *Amblyomma cajennense* en América del Sur. Entre 1997 y 2002 se han comunicado 3.649 casos a los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC). Con respecto a la patogenia de esta bacteria, cabe destacar que, además de la ya citada invasión del endotelio con el consiguiente aumento de la permeabilidad que origina edema, hipovolemia, hipoproteinemia e hipotensión, se produce un consumo elevado de plaquetas que lleva a la trombocitopenia en el 50% de los casos. En el inicio de la enfermedad el cuadro clínico suele ser poco específico, con un periodo de incubación de 7 días, aunque puede oscilar entre 2-14 días. Los síntomas más frecuentes son malestar, fiebre, cefalea y mialgia. En el 25% de los casos aparece conjuntivitis, insuficiencia respiratoria grave, ictericia y afectación neurológica, que supone el principal factor de morbilidad. Otras manifestaciones graves incluyen fallo respiratorio y renal, miocarditis y necrosis de dedos de manos y pies, lóbulo auditivo, etc. La tasa de casos fatales en pacientes no tratados oscila entre 10-25%, existiendo casos fulminantes. En contraste con otras rickettsias del GFM, *R. rickettsii* generalmente no produce escara en el lugar de la picadura. Además, en el 10% de los pacientes el exantema está ausente, lo que produce un retraso en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Otras rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas de interés en nuestro medio

R. sibirica subespecie *mongolotimonae* se aisló por primera vez en 1991 de ejemplares de

Hyalomma asiaticum recogidos en Mongolia y China. Se trata de una especie antigénica y genotípicamente única dentro del GFM, por lo que inicialmente se propuso el nombre de *R. mongolotimonae*. Sin embargo, estudios moleculares han evidenciado su cercanía al complejo *R. sibirica*. *R. sibirica mongolotimonae* fue aislada por primera vez en Francia en 1996 en un paciente hospitalizado en marzo (mes atípico para una FB). El paciente no tenía antecedentes de viaje y había sido picado por garrapatas del género *Hyalomma*, presuntamente introducidas por aves migratorias. Posteriormente, se han documentado nueve casos en Francia, dos en Grecia, dos en Portugal y uno en España con una incidencia predominante entre los meses de marzo y primeros de julio, lo que constituye una característica específica de la infección. Entre los síntomas detectados en varios pacientes destaca una linfangitis que se extiende desde la escara de inoculación. Estos hechos, junto a la observación de múltiples escaras de inoculación, constituyen aspectos propios de la enfermedad lo que debe ser considerado en el diagnóstico diferencial de las rickettsiosis en Europa, África y Asia.

R. akari produce la denominada viruela rickettsiósica y se transmite por el ácaro del ratón *Allodermomyssus sanguineus*. Fue descrita inicialmente en Nueva York en 1946 y posteriormente en Sudáfrica, Corea y la antigua Unión Soviética. El periodo de incubación es de 10 días. El signo inicial es la aparición de una pápula en el lugar de la picadura que progresa a escara negra. A los 2-6 días del inicio de la fiebre, aparece el exantema, maculoso al principio y luego papular, en cuyo centro se desarrolla una vesícula. El exantema muestra infiltración epidérmica por células mononucleares. Los vasos sanguíneos se ven muy afectados, con trombos de fibrina y extravasación de hematíes. Es frecuente la adenopatía regional, fiebre remitente y cefaleas intensas. La erupción cutánea puede confundirse con varicela, meningitis meningocócica, sarampión atípico u otras rickettsiosis. No se han descrito casos fatales y la fiebre remite en una semana sin tratamiento.

R. slovaca fue aislada por primera vez en Checoslovaquia en 1968 a partir de *D. marginatum*. Sin embargo no fue hasta 1980 cuando se produjo la primera sospecha de que pudiese infectar a personas. La tasa de infección en *D. marginatus* y *D. reticulatus* varía de un 1% a más de un 75% y se sabe que actúan como vectores y reservorios al presentar transmisión transestádica y transovárica. La lesión en la zona de la picadura produce una escara necrótica en el punto de inoculación rodeada de un halo eritematoso que se localiza, generalmente, en el cuero cabelludo, que es la zona donde preferentemente estas garrapatas pican a las personas. El síntoma más significativo es el engrosamiento de los ganglios linfáticos, lo que ha llevado a denominar esta rickettsiosis como TIBOLA (*tick-borne lymphadenopathy*) o también DEBONEL (*Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy*). El espectro completo de la

sintomatología de esta infección está aún por determinar, aunque existe la sospecha de que algunos pacientes pueden sufrir trastornos neurológicos. El resto de los síntomas suelen ser moderados, aunque se pueden producir secuelas de larga duración como astenia y alopecia en la escara, que puede durar varios meses. Aunque el agente causante de este cuadro clínico es *R. slovaca*, datos recientes evidencian la presencia de otras especies en *D. marginatum*, como *R. raoultii*, especie de reciente descripción que englobaría a las variantes RpA4 y DnS14, y Candidatus *R. rioja* entre otras, por lo que se hace necesario estudiar el papel que puedan tener otras rickettsias en la etiología de la infección.

R. felis fue detectada por primera vez en pulgas de *Ctenocephalides felis* en 1918. Aunque su patogenicidad fue demostrada por primera vez en 1991 en un paciente con una enfermedad febril semejante al tifus murino en Texas (EE.UU.) y no pudo ser cultivada y caracterizada hasta el año 2001, evidenciándose que sólo puede crecer a bajas temperaturas. Posteriormente en 2002, se infectaron tres pacientes en México que sufrieron fiebre, exantema, dolor de cabeza y afectación del sistema nervioso central. Recientemente se han descrito casos en España, Brasil, Alemania y sudeste asiático. Además, en España, Francia, Reino Unido, Brasil, Argentina, Etiopía, Tailandia y Nueva Zelanda se ha detectado en pulgas. Por el momento no se conocen en profundidad sus características clínicas y su incidencia, pero los datos epidemiológicos (reservorio en animales peridomésticos), vector de transmisión y cuadro clínico similar al del tifus murino hacen pensar que un número importante de casos de fiebre de duración intermedia y también algunos de los diagnosticados como tifus murino podrían deberse a *R. felis*.

R. aeschlimannii fue clasificada dentro del GFM en 1997, aunque había sido detectada previamente en *H. marginatum* en Zimbabwe, Portugal, Mali y Níger. En 2002 se produjo el primer caso de infección humana en un paciente que presentaba un cuadro clínico compatible con FB similar al causado por *R. conorii* subespecie *conorii*. Por otra parte, en España en 2003 se publicó un estudio de 144 casos de FB, y en 11 de ellos los pacientes presentaron múltiples escaras. Teniendo en cuenta la baja prevalencia de *R. conorii* en *R. sanguineus* en nuestro área y su baja afinidad para picar a personas, se ha postulado que algunos de los casos de FB podrían haber sido causados por *R. aeschlimannii*.

En 1993 se denominó *R. massiliae* a una rickettsia que había sido aislada, un año antes, a partir de *R. sanguineus* en Francia, y que mostraba diferencias dentro del grupo de las fiebres manchadas. Se ha detectado en Portugal, Grecia, España, Argentina y algunas áreas de África en otras especies de garrapatas del género *Rhipicephalus*. En 1996 se detectó una variante llamada Bar29 en Cataluña en *R. sanguineus*. Esta rickettsia parece resistente a la rifampicina en cultivos celulares y de

hecho se ha constatado el fracaso terapéutico en un grupo de niños diagnosticados de FB en Cataluña, en los que se había utilizado este antibiótico, lo que hace sospechar su implicación en enfermedad humana en dicha zona. El primer caso humano fue confirmado retrospectivamente en 2005 en Francia, en un paciente diagnosticado de FB en 1985 que presentaba fiebre, escara en el punto de inoculación, erupciones máculo-papulares y hepatomegalia.

Estudios medioambientales recientes llevados a cabo en Castilla y León, zona endémica de FB, indican la presencia de *R. massiliae* en garrapatas. Este dato, junto a la baja presencia de *R. conorii* en *R. sanguineus*, de nuevo sugiere que algunos cuadros de FB podrían estar produciéndose por otras especies de rickettsias del GFM.

R. monacensis fue aislada por primera vez en 2002 a partir de *Ixodes ricinus* en un parque de Berlín. En España se han detectado rickettsias cercanas a *R. monacensis* y a las variantes IRS3 e IRS4 en la misma especie de garrapata, aunque no han podido ser cultivadas. Recientemente se ha descrito en España por primera vez su papel patógeno, en dos pacientes que presentaban cuadros clínicos compatibles con FB.

R. helvetica por el momento no puede ser considerada patógena. Se aisló por primera vez en 1979 a partir de *I. ricinus* recogidos en Suiza. Posteriormente se ha detectado en ixódidos en Francia, Suecia, Bulgaria, España e Italia. Su distribución no se limita a Europa, puesto que también se ha detectado en Japón. Todos los casos en los que se ha sospechado que *R. helvetica* era el agente etiológico de una infección se basan en diagnósticos serológicos. Por tanto, se precisa evaluar estos resultados en detalle, además de cultivar la bacteria a partir de una muestra clínica para confirmar su patogenicidad.

3.2.2. Grupo de las fiebres tíficas (GFT). Los representantes de este grupo son dos: *R. prowazekii*, responsable del tifus exantemático epidémico y *R. typhi*, que produce el llamado tifus murino o endémico.

Tifus exantemático epidémico

La enfermedad producida por *R. prowazekii* se conoce desde el año 1083 y se transmite por el piojo corporal, *Pediculus humanus* variedad *corporis*. El reservorio es el ser humano, en el que la infección persiste durante los periodos entre las epidemias. El vector se infecta al alimentarse de sangre de un paciente con enfermedad aguda, excretando rickettsias por la heces durante 5-7 días. El hombre se infecta al contaminarse la picadura u otras heridas superficiales de la piel con las heces o con el piojo aplastado sobre el sitio de la picadura. También se puede adquirir la enfermedad a través de la inhalación de heces secas de piojos infectados o por contacto directo a través de las mucosas. En algunas zonas de Estados Unidos, las ardillas voladoras son un reservorio y la pulga de la ardilla un vector potencialmente transmisor de la enfermedad al hombre. No se transmite directamente entre

personas. En la actualidad, el tifus epidémico está circunscrito a regiones montañosas del sur y centro de América, México, África Central y Oriental y algunos países de Asia. La proliferación de piojos se propicia en situaciones de catástrofe, hambruna, falta de higiene y hacinamiento, aumentando el riesgo de la enfermedad y favoreciendo la aparición de brotes como los sucedidos después de la guerra de Burundi en 1997, en Rusia en el mismo año y en Perú en 1998.

El cuadro clínico aparece tras un periodo de incubación de 10-14 días y se caracteriza por fiebre alta, escalofríos, cefalea, artromialgia y anorexia. El 25-30% de los pacientes manifiesta tos seca, mareos, fotofobia, náusea, dolor abdominal y estreñimiento. El exantema suele aparecer en el 90-95% de los casos y comienza en el tronco a los 4-7 días y se extiende a extremidades, habitualmente respetando la cara, las palmas y plantas. Inicialmente es maculoso, rosado y desaparece con la presión, evolucionando a maculopapular de color más rojizo y, posteriormente, a petequeal y confluyente en los casos graves. En estos casos, durante la evolución pueden producirse meningoencefalitis, neumonitis, miocarditis e insuficiencia renal. Suele existir elevación ligera de las transaminasas y en la mitad de los casos anemia normocítica y normocrómica, además de trombocitopenia moderadas. La mortalidad es elevada y se correlaciona con la edad, alcanzando un 60% en mayores de 50 años.

Tifus murino o endémico

En 1926 Maxcy estableció las diferencias entre esta zoonosis y el tifus epidémico. La enfermedad, causada por *R. typhi*, tiene una distribución mundial con áreas endémicas extensas en los cinco continentes. En España hay evidencias de la existencia de casos en las provincias de Sevilla, Huelva, Murcia y las Islas Canarias. En 1931 se aisló el microorganismo de pulgas y cerebro de rata capturadas cerca de pacientes afectados por la enfermedad. Muchos autores opinan que su importancia clínica y sanitaria se ha subestimado ya que en la actualidad el tifus murino constituye un paradigma de enfermedad infecciosa emergente. Su importancia a nivel mundial queda reflejada en la elevada frecuencia con que se detectan anticuerpos específicos en diferentes estudios sero-epidemiológicos, oscilando entre 3-36%. En España, un estudio realizado en Sevilla, ha estimado una incidencia del 7% como causa etiológica de la fiebre de duración intermedia, si bien parece que este dato podría estar subestimado, teniendo en cuenta la existencia de casos de curso leve que son tratados en atención primaria y que no se computan al no llegar a las consultas de los especialistas.

Clásicamente, se ha considerado que los reservorios esenciales de *R. typhi* son las ratas peridomésticas *Rattus rattus* y *R. norvegicus*, actuando la pulga de rata *Xenopsylla cheopis* como vector. La pulga se infecta al ingerir sangre de ratas infectadas. A continuación, la rickettsia se divide en su intestino y es excretada por las heces, lo que

infecta a nuevas ratas a través de erosiones de la piel que el animal se produce al rascarse. Además, las pulgas infectadas transmiten el microorganismo por vía transovárica a toda su descendencia. La transmisión a humanos es accidental por contaminación del lugar de la picadura o de lesiones cutáneas con heces de la pulga. Recientemente se ha constatado que la pulga de gato, *Ctenocephalides felis*, puede desempeñar un importante papel en el ciclo biológico y en la transmisión de *R. typhi*. La presencia de casos en áreas donde no se han detectado ni ratas ni sus pulgas infectadas por esta rickettsia, junto a la gran abundancia de gatos en muchos hogares (sin olvidar que *C. felis* tiene gran avidez por picar a personas) hacen que posiblemente nos encontremos ante un relevante problema de salud pública.

La mayor parte de los casos se producen entre mayo y octubre, que son los meses de mayor actividad de los vectores, aunque sólo un 3-30% de los pacientes refiere picadura de artrópodo en los días previos a la enfermedad. El periodo de incubación oscila entre 7-14 días. Desde el punto de vista clínico, los síntomas son bastante inespecíficos e incluyen fiebre, exantema, artromialgia y cefalea. El exantema, que se produce en el 60-70% de los casos dura una media de 4 días, es maculopapuloso tenue y afecta al tronco y extremidades, respetando palmas y plantas. Los casos graves han sido descritos en el 2-4% de los casos. Otro aspecto frecuente del tifus murino es la alteración en la bioquímica hepática con un alto porcentaje de pacientes que muestran hepatolisis moderada. Sin embargo la hepatitis y la colestasis son menos frecuentes. También se producen alteraciones hidroelectrolíticas en sangre como consecuencia del daño microvascular (disminución de los niveles de albúmina, potasio, sodio y calcio) y un alargamiento en los tiempos de coagulación, así como trombopenia.

3.3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La selección de las muestras dependerá en cierta medida de la sintomatología del paciente, así como de la infraestructura y capacidades disponibles en el laboratorio de microbiología donde se vayan a procesar. Como regla general, se intentará obtener aquellas más sencillas y con métodos menos invasivos. En principio, las muestras más adecuadas para el diagnóstico de las rickettsiosis son: suero, sangre con citrato, contenido de pápulas o vesículas y biopsia cutánea de la escara de inoculación. En el caso de afectación neurológica, también se debe recoger LCR.

3.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir una serie de condiciones generales que van a condicionar, en cierta medida, la eficiencia y calidad de los resultados obtenidos. Estos requisitos son: selección de la muestra más adecuada y rentable, recogida en cantidad suficiente y de forma estéril y a

ser posible antes del inicio del tratamiento antimicrobiano.

Además, para realizar el mejor diagnóstico microbiológico posible también resulta de vital importancia que la muestra se transporte en condiciones idóneas y, en el caso de que se vaya a realizar cultivo, que éste no se demore más allá de 24 horas. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles de un solo uso y con cierre hermético.

En el caso de envío de muestras a centros de referencia o investigación preparados para la realización de cultivos, la sangre debe enviarse a ser posible el mismo día de la extracción y sin congelar. Si el envío no se va a realizar de manera inmediata, conviene congelar a -80°C hasta su envío, que debe llevarse a cabo en hielo seco para prevenir la descongelación. Aunque hay pocos estudios sobre la disminución de la viabilidad de las rickettsias a temperatura ambiente o por la acción de la congelación-descongelación de la muestra, es conocida la dificultad de aislar estos agentes y, más aún, a partir de muestras en las que se demora el cultivo. También hay que tener en cuenta la pérdida de viabilidad por temperatura elevada ($>37^{\circ}\text{C}$), sobrecrecimiento de otras bacterias así como la refrigeración a largo plazo, factores que pueden comprometer el aislamiento. Menos requerimientos se precisan para el diagnóstico molecular, puesto que los ácidos nucleicos permanecen estables aún cuando la bacteria no es viable. Por tanto, en estos casos las muestras se enviarán refrigeradas. El suero, al igual que las muestras que están potencialmente contaminadas con otro tipo de bacterias (como muestras de piel) deben también enviarse refrigeradas.

El recipiente de recogida se identificará con los datos del enfermo (nombre y localización), y debe protegerse para que no se rompa en su transporte al laboratorio.

Los envases para la recogida de las muestras dependen del tipo de muestra que se va a recoger, siendo, en resumen:

- Tubos estériles con tapón de rosca para sangre y LCR.
- Frascos estériles de boca ancha con tapón de rosca para fragmentos de tejidos, garrapatas, etc.
- Torundas o hisopos de algodón estériles para tomar muestras de superficies corporales como las secreciones de pápulas y máculas.

Las muestras deben ir acompañadas obligatoriamente del volante de petición para Microbiología. En este volante debe hacerse constar la siguiente información: datos del paciente (nombre y apellidos, número de historia clínica, fecha de nacimiento y sexo); datos clínicos y epidemiológicos (orientación diagnóstica, tratamiento antimicrobiano, enfermedad de base, antecedentes de interés como viajes, picaduras, etc.) y datos del centro y médico solicitante.

3.5. MANEJO DE LA MUESTRA EN SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Todas las muestras deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente o inadecuada. En todos estos casos se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

3.6. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

El tipo de procesamiento y los medios utilizados dependen de las características de cada muestra. En la tabla 4 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología, indicando aspectos generales sobre la recogida, tiempo y temperatura de transporte y conservación.

En términos generales, los procedimientos utilizados son los habituales en el laboratorio de microbiología, si bien hay que tener en cuenta que, habitualmente, la carga microbiana en este tipo de infecciones es menor que en el caso de otras bacterias. Esto obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo. Las muestras inaceptables no deben procesarse y el médico responsable del paciente debe ser informado inmediatamente.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico (aspecto, color, coágulos, etc.), así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.
4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible, más aún en el caso de que se persiga el aislamiento del agente, garantizando de esta forma la viabilidad.

Tabla 4. Muestras necesarias para el diagnóstico de las rickettsiosis.

MUESTRA	RECOGIDA	TRANSPORTE Tiempo y temperatura	CONSERVACIÓN Tiempo y temperatura	PRUEBA DIAGNÓSTICA	NOTA
Suero	Tubo con tapón de rosca	≤24 h, 2-8°C	+24h, -20°C	IFI ¹	
Sangre con EDTA	Recoger en tubo con EDTA	≤ 24 h, 2-8 °C.	+24h, -20°C	PCR ²	El EDTA ³ dificulta el cultivo
Sangre citratada	Recoger en tubo con citrato	≤ 24 h, 2-8 °C.	+24h, -60/-80°C (no varias descongelaciones)	PCR, Cultivo ⁴	
Sangre heparinizada	Recoger en tubo con heparina	≤ 24 h, 2-8 °C.	+24h, -60/-80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo	La heparina ⁵ puede inhibir la PCR
LCR	Recoger en tubo estéril	≤ 24 h, 2-8 °C.	+24h, -20°C	PCR	
Biopsia cutánea	Se recomienda asepsia en la toma de la muestra. Colocar el tejido en un tubo o frasco estéril con suero fisiológico estéril para prevenir la desecación	≤24 h, 2-8°C	+24 h, -20°C	Microscopía ⁶ PCR	Muestra de la escara de inoculación
Contenido de pápulas/máculas	Recoger en tubo/torunda estériles	≤24 h, 2-8°C	+24 h, -20°C	PCR	

¹Inmunofluorescencia indirecta. ²Reacción en cadena de la polimerasa. ³El EDTA levanta la monocapa de células Vero dificultando el cultivo. ⁴Muy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3, por lo que sólo se realiza en laboratorios de referencia e investigación. ⁵Evitar el uso de heparina para muestras en las que se vaya a realizar diagnóstico molecular, puesto que este anticoagulante puede inhibir la PCR. ⁶Previo tinción de tejido infectado, incluyendo la lesión de inoculación, por el método de Giménez.

3.7. CULTIVOS. SELECCIÓN DE MEDIOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Para el cultivo de las rickettsias del GFM se requiere medio MEM (Minimum Esencial Medium) sin antibiótico suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (concentración final, CF), 2 mM de glutamina CF y 0,2% (CF) de aminoácidos no esenciales. La incubación de los cultivos se lleva a cabo a 33-35°C en ausencia de CO₂. Para *R. typhi* se requiere el mismo medio suplementado con SBF al 2% (CF).

El diagnóstico definitivo de las rickettsiosis requiere el aislamiento e identificación de la especie a partir del cultivo, lo que supone con frecuencia, varios días o semanas de espera. El cultivo de lleva a cabo en células Vero E6 o fibroblastos L92. El efecto citopático producido no es muy característico ni específico de especie y, aunque puede aparecer a las 24-48 h post- inoculación, generalmente se necesitan 5-7 días para su desarrollo. El cultivo se puede acelerar si se inocula la muestra sobre una monocapa de las células susceptibles previamente crecidas sobre un portaobjetos circular (*shell vial*, SV), seguida de una centrifugación. Después de 5-7 días de incubación se procede a detectar la presencia de la bacteria mediante tinción de Giménez, IFI con anticuerpos específicos o PCR. Este procedimiento resulta muy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con

nivel de seguridad 3, por lo que sólo se realiza en laboratorios de referencia o investigación. Además, el principal problema es su baja sensibilidad por lo que se recomienda no realizar este procedimiento en el caso de muestras procedentes de pacientes que hayan comenzado un tratamiento antibiótico.. Por ello resulta un procedimiento no rutinario que debe hacerse sólo en casos seleccionados. Sin embargo, es la técnica diagnóstica más específica, fundamental para la obtención de antígenos, para estudiar la sensibilidad a los antibióticos y en la determinación de las especies de *Rickettsia* predominantes en un área determinada.

3.8. CRITERIOS PARA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Hay que tener en cuenta que la serología está limitada por las reacciones cruzadas entre el grupo de las fiebres manchadas y las del grupo tífus. La IFI es una de las técnicas más sensibles y la más ampliamente utilizada en la actualidad para el diagnóstico de las rickettsiosis exantemáticas, ya que permite la detección por separado, de las diversas inmunoglobulinas, lo que ayuda a diferenciar entre infecciones recientes y pasadas. Se realiza utilizando un sustrato antigénico inactivado con calor. Estos antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diluciones seriadas del suero del

paciente. La detección de anticuerpos en el suero del paciente se realiza mediante una reacción antígeno–anticuerpo que se revela con una antiglobulina humana marcada con fluoresceína, que permite la visualización de los microorganismos mediante microscopio de fluorescencia. Todas las inmunoglobulinas se positivizan tardíamente, a partir de la primera semana de comienzo de los síntomas. La confirmación del diagnóstico requiere detectar una seroconversión, que se produce en la fase de convalecencia, entre la tercera y cuarta semana. Para una correcta interpretación de los resultados de serología, se deben tener en cuenta los datos de reactividad basal de la población en zonas endémicas.

Como técnicas experimentales, para evitar la reactividad cruzada, en algunos casos se utilizan ensayos de *immunoblotting* con sueros sometidos a absorciones con antígenos heterólogos. Este método da como resultado un considerable aumento de la especificidad si bien tiene una baja sensibilidad.

Las técnicas moleculares, como la PCR, permiten un diagnóstico rápido y específico al detectar DNA de rickettsia en tejidos infectados, cultivos y garrapatas.

3.9. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

En el curso de los cuadros clínicos causados por *R. prowazekii*, que produce el tifus epidémico, en ocasiones se puede producir infección pulmonar. Hay que tener en cuenta que este microorganismo presenta una especial peligrosidad en su manejo y que es responsable de infecciones adquiridas en el laboratorio, si bien *R. prowazekii* puede ser inactivada por los desinfectantes habituales. Por ello, el procesamiento de las muestras sospechosas (pulmón, bazo, ganglios linfáticos), en las que hay una concentración de organismos mayor a la de la sangre, requiere medidas de bioseguridad del nivel 3 y personal preparado. En los laboratorios clínicos se recomienda realizar pruebas serológicas de sueros pareados. En la separación del suero a partir de la sangre es necesario tener un especial cuidado para evitar la producción de aerosoles durante la manipulación. Dada la peligrosidad que implica el trabajo con microorganismos vivos, el intento de aislamiento o la detección por inmunofluorescencia directa deben limitarse y las muestras post-mortem de los casos fatales deben enviarse a un laboratorio de referencia.

En algunos casos puede resultar interesante el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos, así como la aplicación de técnicas de tipificación molecular aunque, debido a las características de estos agentes, quedan reservadas para estudios de investigación.

3.10. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

El microbiólogo ha de conocer la situación clínica del paciente en estudio para realizar una adecuada interpretación con los datos disponibles. El laboratorio de microbiología debe emitir un informe

donde se expongan las técnicas realizadas y la interpretación de los resultados obtenidos, sobre todo cuando aparezcan resultados dudosos o de difícil explicación.

La interpretación de los resultados serológicos se debe hacer a la luz de los datos clínicos y de la utilización simultánea otras técnicas para aumentar la sensibilidad diagnóstica. Más aún teniendo en cuenta la reactividad cruzada entre las distintas especies de *Rickettsia*.

Cuando se notifica un resultado de PCR negativo se debe tener en cuenta que, en ocasiones, la carga bacteriana en algunas muestras suele ser muy baja y por tanto los métodos moleculares pueden no ser suficientemente sensibles por lo que un resultado negativo no descarta una infección.

Los cultivos en los que se aíslan contaminantes de la microbiota comensal del área anatómica de estudio se informarán como "microbiota comensal o saprofita".

Los cultivos sin aislamiento se informarán como "no se aíslan microorganismos".

3.11. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO.

Las muestras de tejidos pueden examinarse microscópicamente mediante tinción de Giménez, que permite visualizar las rickettsias pero no diferencia a nivel de especie ni tampoco de otros microorganismos por lo que su detección suele ser dudosa en muchos casos.

Las técnicas moleculares son un instrumento valioso para el diagnóstico etiológico de las rickettsiosis, ya que pueden detectar en poco tiempo genoma de todos los patógenos potenciales, no dependiendo de la viabilidad del microorganismo. Estas técnicas se ven menos afectadas que los cultivos por los tratamientos antibióticos previos, aunque también disminuyen la sensibilidad, y la obtención de los resultados es mucho más rápida. Además, se pueden realizar en muestras obtenidas por técnicas no invasivas (LCR, sangre, linfocitos de sangre periférica, plasma, suero) y tienen alta sensibilidad y especificidad. Por el momento, la mayor parte de las técnicas descritas son de desarrollo propio (*in house*), y no están comercializadas. Los genes más comúnmente analizados son los que codifican dos proteínas de la membrana externa: *rOmpA* (presente en todas las especies excepto *R. helvetica*, *R. australis*, *R. bellii* y *R. canadensis*) y *rOmp B* (presente en todas las especies excepto *R. helvetica*, *R. bellii* y *R. massiliae*). También se utilizan el gen *gltA*, que codifica la citrato sintetasa (válido para todas las rickettsias), el gen que codifica la proteína de 17-kDa (válido para todas las rickettsias del GFM) y el gen D (válido para la mayoría de las especies). Recientemente, se ha desarrollado una PCR-RLB [RLB (del inglés *reverse line blotting*)] que utiliza como diana el espacio intergénico 23S-5S ARNr que, junto a una hibridación en fase reversa utilizando sondas especie-específicas, permite la identificación de la especie implicada sin necesidad de secuenciación. Este método es altamente sensible y

específico, tanto para muestras clínicas como ambientales. Cuando se desee una mayor sensibilidad, hay que recurrir a PCR anidadas y posterior hibridación en fase reversa. Además, recientemente se ha desarrollado la tecnología de PCR a tiempo real que permite la obtención de resultados en muy poco tiempo (menos de una hora). Todas estas ventajas hacen que la PCR se presente como la prueba ideal para el diagnóstico de estas infecciones, aunque existen algunas desventajas, como son la limitación para realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos y la imposibilidad de coleccionar los aislados para futuras investigaciones. Quedan por establecer algunos parámetros antes de incorporar estas pruebas a los protocolos de diagnóstico clínico, como por ejemplo el tipo de muestra óptima, control interno de inhibición, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de la técnica. Estas razones hacen que, generalmente, el tratamiento de las rickettsiosis deba iniciarse sobre la base proporcionada por datos clínicos-epidemiológicos.

3.12. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

En el diagnóstico no se deben utilizar ensayos fabricados en el propio laboratorio que no estén validados y por tanto no garanticen la adecuada calidad de los resultados obtenidos. Se deben seguir las instrucciones del fabricante en los ensayos comerciales y, en caso contrario, se deben notificar los cambios que se produzcan en el procedimiento normalizado de trabajo. No se deben aceptar informes que no sean inteligibles para el clínico o aquellos en los que no quede reflejado claramente el tipo de ensayo que se ha realizado y su correcta interpretación.

4. ENFERMEDAD DE WHIPPLE

4.1. INTRODUCCIÓN E HISTORIA

La enfermedad de Whipple (EW) es una infección multisistémica poco frecuente, causada por la bacteria *Tropheryma whipplei*. La enfermedad tiene un curso crónico e insidioso y se manifiesta con una gran variedad de síntomas poco específicos entre los que destacan: fiebre, pérdida de peso, diarrea, dolor abdominal, artritis, hiperpigmentación de la piel y adenopatías. Se han descrito también la afectación del sistema nervioso central, endocarditis y uveitis asociadas o no a síntomas gastrointestinales.

Sin tratamiento antibiótico tiene una evolución fatal. Se han recomendado varias pautas, principalmente empleando tratamientos prolongados con fármacos que atraviesen la barrera hematoencefálica como el cotrimoxazol, para evitar las recurrencias asociadas a la afectación del sistema nervioso central, aunque por el momento, no hay recomendaciones específicas de tratamiento.

El diagnóstico clínico de esta enfermedad puede ser complejo, dada la amplia variedad de síntomas que se pueden presentar. Al no existir ningún signo ni síntoma específico, la confirmación del diagnóstico mediante pruebas de laboratorio es fundamental. Normalmente, se ha realizado en los laboratorios de

anatomía patológica mediante la visualización de inclusiones PAS-positivas, diastasa-resistentes en el interior de macrófagos, que presentan un aspecto espumoso en muestras de biopsias intestinales o de otros tejidos afectados. Actualmente, se emplean estas técnicas asociadas a las de biología molecular basadas en PCR, que permiten detectar fragmentos del ADN de *T. whipplei* en distintas muestras y así establecer el diagnóstico etiológico.

La EW fue descrita en 1907 por el patólogo George Hoyt Whipple, como una "lipodistrofia intestinal". En 1950, se describió la presencia de macrófagos espumosos con inclusiones PAS-positivas y diastasa-resistentes en biopsias de pacientes con la enfermedad. Estas inclusiones han sido consideradas largo tiempo, como diagnósticas de la enfermedad. Durante años, se sospechó una causa infecciosa, que no se pudo demostrar hasta que en 1961 se observó por microscopía electrónica, la presencia de bacterias con forma bacilar en el interior de macrófagos de la mucosa intestinal de un paciente afectado por la enfermedad, lo que representó el primer dato objetivo de una posible causa bacteriana.

En 1991 el empleo de PCR universal del gen 16S ARNr en una muestra de biopsia duodenal de un paciente que padecía la enfermedad, permitió detectar una bacteria desconocida perteneciente al grupo de los actinomicetos. En 1992 se diseñó una PCR específica para su detección y se propuso el nombre de *Tropheryma whippellii* al reconocer que se trataba de un microorganismo no descrito. En 2000, se consiguió finalmente cultivar la bacteria en cultivos celulares complejos, se describió formalmente como especie y se latinizó su nombre, quedando como *Tropheryma whipplei*.

4.1.1. Descripción de *Tropheryma whipplei*. Su nombre deriva del griego *trophe* (alimentación), *eryma* (barrera) y del apellido de la primera persona que describió la enfermedad.

La secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S de *T. whipplei* ha demostrado, que pertenece al grupo de los actinomicetos y que tiene un alto contenido de G+C en su ADN. Se trata de un bacilo Gram positivo aerobio de unos 0.2 x 2 µm, que tiene una delgada pared celular, rodeada de una membrana externa que le da un aspecto trilaminar al microscopio electrónico. La bacteria no se tiñe bien con la tinción de Gram en tejidos y aparece como Gram negativa cuando se tiñe a partir de cultivos celulares.

Durante años, se ha considerado como un microorganismo no cultivable ya que a pesar de numerosos esfuerzos, la bacteria no se pudo cultivar hasta el año 2000, en que se consiguió en medios celulares con líneas de fibroblastos humanos, comprobándose que tiene un tiempo medio de duplicación de unos 18 días.

El cultivo de la bacteria ha permitido la secuenciación de su genoma completo y se ha comprobado que *T. whipplei* tiene un genoma reducido (< 1Mb) y que carece de rutas de biosíntesis de varios aminoácidos y carbohidratos, lo

que determina que necesite adquirir estos nutrientes y de ahí su dificultad para crecer en cultivos convencionales. A partir de este descubrimiento, se ha diseñado un medio sintético para su cultivo donde la bacteria crece extracelularmente. Sin embargo, actualmente sólo se ha conseguido en laboratorios de investigación muy especializados y aún parece estar lejos su incorporación a los laboratorios de diagnóstico microbiológico.

El estudio por PCR de la región ITS 16S-23S (*internal transcribed spacer*) y del dominio III del gen que codifica para el 23S ARNr de varias cepas descritas, ha demostrado cierta heterogeneidad entre ellas que se ha empleado para su tipado, describiéndose 4 genotipos. Se ha especulado, que las distintas variantes podrían distribuirse geográficamente de forma diferente y estar relacionadas con la zona de adquisición de la enfermedad, pero hasta ahora no se ha descrito una relación entre genotipos y síntomas o gravedad de la enfermedad.

Se ha considerado que *T. whipplei* es un microorganismo intracelular obligado, pero estudios realizados con sondas de hibridación fluorescentes y microscopia confocal han demostrado que se puede localizar en el interior o entre las células de la lamina propia intestinal. En los cultivos celulares se multiplica activamente en el interior de las células, pero sobrevive tanto intracelular como extracelularmente, lo que indicaría que no es un patógeno intracelular estricto. En sangre periférica, circula en el interior de las células mononucleares (lo que explica su carácter multisistémico).

4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La EW se ha considerado tradicionalmente como una enfermedad gastrointestinal aunque no en todos los casos descritos es así, ya que hasta un 15% de los pacientes no presenta, en el momento del diagnóstico, los síntomas gastrointestinales considerados típicos (Tabla 1).

La forma clásica de la enfermedad, se caracteriza por un periodo prodrómico asociado a artralgias migratorias, poliartritis y fatiga seguidas por un síndrome progresivo de dolor, distensión abdominal, malaabsorción y diarrea que conducen a una pérdida de peso severa. En un 65-95% de los pacientes, las manifestaciones gastrointestinales suelen estar precedidas en varios años por síntomas articulares, que no suelen hacer sospechar la enfermedad, lo que da lugar a un retraso diagnóstico de hasta 5 años desde el comienzo de los síntomas. Sin tratamiento, la EW se asocia a numerosas remisiones y recaídas, con empeoramiento gradual que puede conducir a una caquexia severa, a la afectación de múltiples órganos incluido el SNC y que finalmente conduce a la muerte del paciente. En la mayoría de los casos, los síntomas gastrointestinales son los que conducen al diagnóstico y suelen manifestarse por episodios de diarrea acuosa con esteatorrea (asociada a la malaabsorción intestinal), dolor abdominal tipo cólico y distensión abdominal. En un 52% de los pacientes

Tabla 5. Principales manifestaciones clínicas de la enfermedad de Whipple.

Manifestaciones Clínicas
Frecuentes (90-50%) Pérdida de peso Diarrea Dolor Abdominal Artralgias Artritis Fiebre de bajo grado Adenopatías Hiperpigmentacion de la piel
Menos frecuentes SNC (20-30%) Cambios cognitivos, demencia Nivel de conciencia alterado Manifestaciones hipotalámicas Mioclonias Ataxia Miorritmia oculomasticatoria Miorritmia oculofacial
CARDIOVASCULARES (35-65%) Endocarditis Pericarditis Miocarditis
OFTALMOLÓGICAS (5-15%) Uveitis Retinitis Queratitis Neuritis óptica Edema de papila Vitritis
PULMONARES (30-40%) Tos Derrame pleural

las manifestaciones se acompañan de la presencia de adenopatías periféricas o retroperitoneales que pueden ser de gran tamaño y en ocasiones se confunden con linfomas. La fiebre es otro de los síntomas considerados clásicos pero, suele estar presente sólo en un 40-60% de los casos publicados. Suele ser de bajo grado y presentarse asociada a sudoración nocturna. La fiebre puede aparecer como síntoma aislado o junto a las manifestaciones gastrointestinales o articulares. La hiperpigmentación de la piel es otro de los síntomas que se ha asociado tradicionalmente a la enfermedad. Aparece en un 40-60% de los casos descritos y suele ser responsable de que la enfermedad se confunda con el síndrome de Addison. Las manifestaciones articulares se han descrito entre el 65-90% de los pacientes y constituyen la afectación extraintestinal más frecuente. En la mayoría de los casos, se asocian a las manifestaciones gastrointestinales clásicas,

aunque pueden aparecer aisladas y confundirse con enfermedades reumatológicas. También pueden aparecer mialgias asociadas. Los cambios destructivos de la articulación son raros. La afectación vertebral es infrecuente y suele aparecer en forma de espondilitis y sacroileitis. La alteración neuronal del SNC se ha descrito entre el 20-30% de los pacientes, aunque en estudios post-mortem se ha encontrado hasta en un 91% de los casos. El estudio por PCR o tinción de PAS del LCR ha permitido detectar la bacteria en un elevado porcentaje de casos, incluidos los que cursan sin manifestaciones de SNC. La afectación del SNC puede ocurrir principalmente en tres circunstancias: lo más frecuente son las recaídas después del tratamiento antibiótico de alguna de las otras manifestaciones de la enfermedad, con menor frecuencia aparecen junto con las manifestaciones gastrointestinales o articulares y rara vez aparecen aisladas como la primera o única manifestación (20% de los pacientes presentan alteraciones neurológicas sin afectación de otros órganos). Las manifestaciones neurológicas pueden ser muy variadas y confundirse con muchas otras enfermedades neurológicas. Entre el 50-70% de los pacientes con afectación del SNC presentan deterioro cognitivo, demencia, nivel de conciencia alterado y oftalmoplejia supranuclear. Con menor frecuencia pueden aparecer manifestaciones hipotalámicas, ataxia o convulsiones. Alrededor del 20% de los pacientes, presentan mioclonía oculomasticatoria y mioclonía oculo facial (que consisten en movimientos lentos y rítmicos de los músculos faciales) que se han considerado patognomónicas de la enfermedad. El pronóstico de la enfermedad para los pacientes con afectación del SNC es malo, su supervivencia a los 4 años del diagnóstico es menor del 25%, tienen más recaídas y en muchos casos presentan grandes secuelas.

La afectación cardíaca es frecuente y se ha descrito entre el 20-70% de los pacientes que presentan la forma clásica de la EW. Puede presentarse en forma de pericarditis, miocarditis o con mayor frecuencia endocarditis con hemocultivos negativos, que suele requerir el recambio valvular. Hasta el momento, se han descrito unos 20 casos de endocarditis infecciosa causada por *T. whipplei*, y sólo unos pocos se presenta como única manifestación de la enfermedad. La afectación pulmonar ocurre entre un 30-40% de los pacientes y en un 14% suele haber derrame pleural. Los pacientes describen tos crónica no productiva, dolor torácico y tienen disnea y poliserositis. Entre el 5% y 15% de los pacientes con enfermedad de Whipple presentan afectación ocular, siendo la principal manifestación la uveítis anterior o posterior y en ocasiones vitritis, queratitis, neuritis óptica o edema de papila. Estas manifestaciones suelen aparecer asociadas a las manifestaciones neurológicas o gastrointestinales. En otros pacientes las manifestaciones son aún menos específicas y recuerdan a la sarcoidosis, linfomas, enfermedades granulomatosas o simplemente aparecen como

fiebre de origen desconocido. El sistema endocrino y genitourinario rara vez se ven afectadas por la enfermedad.

4.3. TRATAMIENTO

Sin tratamiento antibiótico la enfermedad tiene una evolución fatal. Por el momento, no hay ensayos clínicos ni estudios comparativos y prospectivos sobre su tratamiento. Las recomendaciones actuales se basan en series retrospectivas de casos tratados de forma empírica. Actualmente, se encuentra en marcha el primer ensayo clínico que evalúa la utilidad del tratamiento inicial con ceftriaxona o meropenem seguido de cotrimoxazol y que recluta pacientes de todo el mundo (<http://www.whippleddisease.info>).

El tratamiento antibiótico se debe encaminar no sólo a tratar la enfermedad en el momento del diagnóstico, sino también a evitar las recaídas (2-33% de los casos en el plazo de unos 5 años) que afectan principalmente al SNC y que se asocian a mal pronóstico. Por tanto, se deben emplear antibióticos que atraviesen la barrera hematoencefálica, aún en ausencia de manifestaciones neurológicas.

Hasta 1970, las tetraciclinas eran el fármaco más usado, pero se han asociado a un elevado número de recaídas sobre todo en el SNC, ya que no atraviesan la barrera hematoencefálica. Se ha recomendado comenzar con un tratamiento parenteral de 2 semanas de duración con ceftriaxona (2g/día) o penicilina G (1.2 millones de U/día) asociada a estreptomina (1g/día), seguido de un tratamiento oral de al menos un año con trimetoprim-sulfametoxazol (160 mg/800 mg 2 veces al día). Como tratamiento alternativo en la fase inicial se pueden emplear imipenem o meropenem y en la fase de tratamiento oral penicilina V, cefixima, doxiciclina, rifampicina o cloramfenicol. No se ha recomendado el empleo de corticoides. En algunos pacientes hay recurrencias a pesar del tratamiento y se ha publicado la utilidad de asociar interferón- γ al tratamiento antibiótico. Recientemente, se ha sugerido la utilidad de tratar con doxiciclina asociada a hidroxiquina, para erradicar el reservorio intracelular de la bacteria en pacientes sin afectación del SNC (indicado por PCR's negativas en LCR). Si hay afectación del SNC, se deben añadir dosis altas de sulfametoxazol o sulfadiazina. En pacientes alérgicos a beta-lactámicos se puede emplear en la fase inicial cotrimoxazol (3 veces/día) asociado a estreptomina (1 g/día) durante 2 a 4 semanas y continuar con trimetoprim-sulfametoxazol 2 veces al día durante al menos un año. En pacientes alérgicos a las sulfamidas se puede sustituir el cotrimoxazol por doxiciclina (100 mg, 2 veces/día) asociado a hidroxiquina (200 mg, 3 veces/día). En endocarditis infecciosa se ha recomendado prolongar el tratamiento parenteral durante 4-8 semanas y se suele requerir el recambio valvular. Cuando hay afectación del SNC o recurrencia se emplea la misma pauta, pero si se usa penicilina G se incrementa la cantidad a 4 MU y se continúa con

trimetoprim-sulfametoxazol dos veces al día durante al menos un año.

Los primeros estudios de sensibilidad de la bacteria se han realizado recientemente en cultivos celulares, en medios sintéticos y por deducción mediante estudios moleculares. En cultivo celular la bacteria es sensible a doxiciclina, cotrimoxazol, rifampicina, penicilinas, macrólidos, y teicoplanina. La sensibilidad al imipenem es variable y es moderadamente sensible o resistente a vancomicina, cefalosporinas y fluorquinolonas. Sin embargo, en medios sintéticos aparece como sensible a fluorquinolonas, cefalosporinas y vancomicina. Del análisis del genoma de la bacteria se deduce que es resistente a trimetoprim al carecer de la ruta de síntesis de su diana (dihidrofolato-reductasa).

En la mayoría de los pacientes el tratamiento antibiótico conduce a una rápida mejoría de los síntomas. La PCR se hace negativa a las dos semanas del inicio del tratamiento, mientras que la tinción de PAS que tarda más en responder. Se ha recomendado la realización de PCR's seriadas en biopsias duodenales y LCR para el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

4.4. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS

La EW es poco frecuente y por el momento no se conoce su incidencia real. Afecta principalmente a varones de mediana edad, raza blanca y origen europeo y parece ser más frecuente en personas de origen rural.

Actualmente, se sabe poco del mecanismo de adquisición y del hábitat de *T. whipplei*. Se cree que está ampliamente distribuida en el medio ambiente e incluso se ha detectado en aguas residuales. Se ha postulado una ruta de adquisición oral y una cierta predisposición genética de los pacientes ya que, la bacteria es ubicua pero se dan pocos casos de la enfermedad. La asociación con la presencia del HLA-B27 no ha podido comprobarse y se ha postulado la presencia de defectos en la inmunidad celular de células T o en la fagocitosis y la capacidad de degradación intracelular de los macrófagos (que serían muy específicos de la inmunidad frente a *T. whipplei* y que no predisponen a la infección con otros microorganismos).

4.5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Los métodos basados en PCR son por el momento, los únicos abordables en laboratorios de diagnóstico microbiológico que permiten confirmar que una enfermedad está causada por *T. whipplei* ya que, el cultivo y la serología sólo están disponibles en laboratorios de investigación y la microscopía electrónica no es fácilmente abordable. Las técnicas de PCR son actualmente necesarias para confirmar el diagnóstico presuntivo realizado por histología y sobre todo, son imprescindibles en los casos que se presentan con histología negativa o con manifestaciones clínicas poco usuales.

La primera caracterización de la bacteria se realizó por PCR con iniciadores universales para detectar el gen que codifica para el ARN ribosómico

16S asociada a secuenciación, directamente realizada en una biopsia intestinal de un paciente con sospecha de enfermedad de Whipple. Este tipo de estrategia es útil cuando se sospecha una etiología bacteriana, la infección puede estar causada por varias especies diferentes y además se dispone de una muestra de un tejido o líquido normalmente estéril. En este caso, la detección de *T. whipplei* puede ser un hallazgo casual no sospechado y ha demostrado ser muy útil en la investigación de casos de endocarditis infecciosa con hemocultivos negativos. Sin embargo, este tipo de técnicas tienen como principal desventaja su facilidad de contaminación y su escasa sensibilidad analítica, por lo que cuando se sospecha la enfermedad, es mejor emplear técnicas de PCR específicas y sólo emplear técnicas de PCR universal cuando no exista seguridad sobre la etiología de la infección.

El cultivo de la bacteria y la secuenciación completa de su genoma ha permitido el diseño de numerosas técnicas de PCR para su detección (Tabla 2), pero por el momento no existe ningún consenso sobre cual es la más sensible y específica para detectar la bacteria en distintos tipos de muestras.

4.5.1. Obtención y conservación de las muestras.

Al ser una enfermedad multisistémica las muestras a recoger dependerán en gran medida de los órganos afectados o las manifestaciones clínicas que presente el paciente. Se debe realizar conjuntamente un estudio histológico con tinción de PAS y microbiológico con técnicas de PCR específicas para detectar *T. whipplei*.

Las muestras más rentables son las biopsias de órganos afectados (duodenal, adenopatías, válvulas cardíacas, etc.) y líquidos estériles (LCR, sinovial y pleural). Algunos autores han detectado la bacteria en muestras de heces y saliva, incluso en pacientes sanos, pero estos resultados no han sido reproducibles y se han asociado a falsos positivos, por lo que no se recomienda el empleo de este tipo de muestras para el diagnóstico.

En general, las muestras enviadas con mayor frecuencia al laboratorio de microbiología clínica son las biopsias duodenales y las adenopatías mesentéricas, ya que la enfermedad se sospecha con mayor frecuencia en pacientes con manifestaciones gastrointestinales. Se deben recoger varias biopsias de las porciones proximal y distal del duodeno y yeyuno, ya que las lesiones pueden tener una distribución parcheada. Las biopsias se deben tomar en todos los pacientes, incluso sin manifestaciones gastrointestinales aparentes. El análisis de muestras de biopsias de pacientes tratados, sirve para la monitorización del tratamiento en pacientes con biopsias previamente positivas. La mucosa duodenal se recupera en las primeras semanas o meses tras el tratamiento, la aparición de biopsias positivas después de una resolución previa puede indicar una recaída.

Tabla 6. Secuencias de algunos iniciadores de PCR para la detección de *Tropheryma whipplei* (Ver referencia 3).

Iniciador	Secuencia (5'-3') (forward/reverse)	Diana	Tamaño del producto (pb)	Referencias
W3FE W2RB	f: GGAATTCCAGAGATACGCCCCCGCAA r: CGGGATCCCATTGCTCCACCTTGCGA	16S rARN	284	Relman y cols 1992. N. Engl. J. Med. 327: 293-301
whipp-frw1 whipp-rev	f: TGA CGG GAC CAC AAC ATC TG r: ACA TCT TCA GCA ATG ATA AGA AGT T	<i>hsp65</i> 1ª amplificación	500	Morgenneg y cols. 2000. J. Clin. Microbiol. 38: 2248- 2253
whipp-frw2 whipp-rev	f: CGC GAA AGA GGT TGA GAC TG r: ACA TCT TCA GCA ATG ATA AGA AGT T	<i>hsp65</i> 2ª amplificación	357	
Twrpoβ-F Twrpoβ-R	f::AAAAAGGCCGACGCGAGTT r: AAAGAGGCTCCAACGCCACG	<i>rpoβ</i>	650	Drancourt y cols. 2001. J. Clin. Microbiol. 39: 2425- 2430
TW27F TW182R 27F-182R	f: TGTTTTGTACTGCTTGTAAACAGGATCT r: TCCTGCTCTATCCCTCCTATCATC 6-FAM-AGAGATACATTTGTGTTAGTTGTTACA- TAMRA	Secuencias repetidas PCR tiempo real Sonda Taqman	105	Raoult y cols. 2006. N. Eng. J. Med. 355: 1503-1505
TW704 TW899 TW795- ANCOR TW817- RED640	f: AAAGAGGTTGAGACTG r: ATCGGTTACAAAATAAGC AGAAGGTTGGCAAGGAAGGC-FLUORESCENCIA LC-RED-640TGCTACTGTGAGGAGTCAAATACT- FOSFATO	<i>hsp65</i> PCR tiempo real sondas FRET	213	Sloan y cols. 2005. J. Clin. Microbiol. 43: 3516-3518

El análisis del LCR es fundamental para la evaluación de la afectación del sistema nervioso central incluso en pacientes sin manifestaciones neurológicas. Está recomendado realizar el análisis de LCR de todo paciente diagnosticado de enfermedad de Whipple ya que, si existe afectación neurológica el pronóstico es peor y las recaídas más frecuentes. Se ha destacado la utilidad de las técnicas de tinción de PAS y PCR del LCR para la monitorización de la efectividad del tratamiento y evaluar recaídas de la enfermedad.

La detección de *T. whipplei* por PCR, se debe realizar siempre en muestras de válvulas cardíacas de pacientes con endocarditis infecciosa con hemocultivos negativos. Se pueden recoger también muestras de adenopatías de cualquier localización, humor vítreo, líquido articular, líquido pleural, tejido esplénico, biopsias cerebrales e incluso sangre periférica que quizás, sería la muestra más sencilla de obtener, pero aunque algunos autores han descrito su utilidad, en general tiene bajo rendimiento y numerosos falsos negativos.

La obtención, conservación y manipulación de las muestras es un paso crítico, pero no es diferente del realizado para el diagnóstico por PCR de otras infecciones bacterianas (ejemplo *M. tuberculosis*). Las muestras deben recogerse asépticamente y a ser posible antes del inicio del tratamiento antibiótico. Se deben introducir en contenedores estériles de tamaño adecuado y deben ser enviadas rápidamente al laboratorio de microbiología clínica sin añadir conservantes ni aditivos, aunque se pueden introducir en suero salino estéril para evitar su desecación, si el envío se va a demorar. Es conveniente, procesar las muestras de forma rápida.

Se deben conservar a 4°C hasta su análisis y durante un máximo de unos 3 días. Si no es posible realizar la extracción de ADN con rapidez o se van a enviar las muestras a un laboratorio externo, se deben conservar congeladas a -20°C o -70°C hasta su análisis, sin ser sometidas a ciclos de congelación y descongelación (una vez congeladas las muestras sólo se deben descongelar para realizar la extracción del ADN). En todos los pasos de obtención y manipulación de las muestras se deben seguir normas de bioseguridad adecuadas.

El líquido articular y la sangre periférica se deben enviar en tubos anticoagulados con EDTA. Si se emplea sangre periférica se debe analizar en su totalidad y no solamente el suero. Es preferible no emplear tubos con heparina, ya que inhibe la Taq ADN polimerasa.

Si la cantidad de muestra recibida es suficiente, es conveniente procesar una fracción y conservar congelada el resto para realizar nuevos análisis si se obtuvieran resultados discordantes.

En ocasiones la visualización de inclusiones PAS-positivas en el laboratorio de anatomía patológica, determina que se necesite después la confirmación por PCR de la presencia de *T. whipplei* en la muestra. Se pueden admitir muestras incluidas en parafina o tratadas con formol, sin embargo hay que considerar que el rendimiento de la extracción del ADN de la muestra y la sensibilidad de detección son menores en estos casos (se producen fragmentaciones del ADN que pueden afectar a la PCR).

4.5.2. Procesamiento de muestras: extracción del ADN. Antes de comenzar la extracción del ADN se debe realizar una homogeneización de la muestra. Si

se habían mantenido congeladas se deben dejar descongelar completamente. En caso de muestras líquidas conviene realizarlo en un agitador rotatorio. Las muestras de biopsias se deben triturar y homogenizar, por ejemplo con un bisturí estéril sin añadir ningún reactivo y luego transferirse a un tubo para realizar la extracción de ADN. Se suelen analizar unos 50-100 mg de muestra. En muestras de líquidos estériles, se debe procesar alrededor de 1 ml de muestra (LCR, pleural y articular) y es conveniente concentrar las células por centrifugación a alta velocidad (≈ 13.000 rpm), para analizar por separado sobrenadante y pellet. Si las muestras a analizar están incluidas en bloques de parafina, se deben desparafinar mediante lavados sucesivos por ejemplo con xileno y finalmente con etanol y tampón salino.

Para la extracción del ADN, se pueden emplear diversos métodos tanto manuales como automatizados adaptados al tipo de muestra que se procese. Como no se conoce la eficacia comparativa de todos los métodos disponibles, es conveniente que cada laboratorio emplee aquel en el que tiene más experiencia. Todos los reactivos y el material que se utilice deben ser de "calidad molecular" y libres de nucleasas. En la literatura los más empleados se basan en la lisis de la muestra con proteinasa K y la posterior extracción y purificación de ácidos nucleicos con fenol/cloroformo/etanol, cloruro de guanidinio y columnas con gel de sílice, resinas quelantes tipo chelex, etc. Es importante considerar que, según el tipo de muestra puede ser necesario prolongar la etapa de lisis con proteinasa K, hasta la destrucción completa del tejido. La etapa de elución o recuperación final del ADN es conveniente realizarla en algún tampón salino (por ejemplo AE), en vez de en agua destilada libre de nucleasas, ya que consigue una mejor conservación y se evita la hidrólisis del ADN. El ADN extraído debe ser recuperado en tubos libres de nucleasas, a ser posible con tapón de rosca (tipo sarstedt) para evitar la apertura de los tubos durante las centrifugaciones. Una vez extraído el ADN total de la muestra se puede conservar a 4°C durante aproximadamente una semana hasta su análisis o se puede congelar a -20° o -70°C. Se deben evitar los ciclos de congelación y descongelación que alteran el ADN.

4.5.3. Detección de ADN de *Tropheryma whipplei* por PCR. Por el momento no hay disponibles técnicas comerciales de PCR para la detección de *T. whipplei*. Se han publicado múltiples métodos "de diseño casero" y por tanto no estandarizados, basados en la amplificación de distintas regiones de su genoma (Tabla 2). No se han publicado estudios que comparen la sensibilidad y especificidad de las regiones más empleadas y cada estudio emplea diferentes técnicas y modos de extraer el ADN, por lo que es difícil recomendar unas u otras para su implantación en laboratorios de diagnóstico. En general, suelen ser métodos sencillos que se pueden incorporar fácilmente a laboratorios de microbiología clínica dotados de un laboratorio de biología molecular.

Se han publicado técnicas basadas en PCR realizada en formato convencional, seminested-PCR o nested-PCR para incrementar la sensibilidad de detección y PCR a tiempo-real con sondas tipo Taqman o FRET para aumentar además la especificidad y facilitar la detección. De la misma manera, se han empleado iniciadores para diversas regiones (Tabla 2). Las utilizadas con más frecuencia son: regiones específicas del 16S ARNr, *rpoB*, *hsp65*, el dominio III del ARNr 23S, la región intergénica 16S-23S ARNr o regiones repetidas del genoma. La detección de la bacteria por PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación como parte del diagnóstico de sospecha de una infección bacteriana (no específicamente de *T. whipplei*), aunque válida en muestras ordinariamente estériles, debe ser confirmada con el análisis de otras dos regiones diferentes y específicas del genoma de *T. whipplei*.

La identidad de los productos de amplificación obtenidos debe confirmarse siempre por secuenciación, hibridación con sondas en formato PCR a tiempo real o southern-blot, PCR-RFLP, etc. El método empleado con mayor frecuencia es la secuenciación automática, por el método de los dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia y detección por electroforesis capilar, seguida del alineamiento con secuencias de *T. whipplei* previamente publicadas en el Genbank. Sin embargo, es un método caro. La PCR a tiempo real con sondas permite la detección específica de los productos formados de una forma sencilla y más rápida que la PCR en formato tradicional, al no tener que realizar geles de agarosa, ni análisis posterior de los productos de amplificación. Quizás la PCR a tiempo real sea el método que se imponga en el futuro, pero hay que tener en cuenta que los reactivos y los equipos necesarios también son caros y por el momento no están disponibles en todos los laboratorios de diagnóstico clínico.

El análisis del dominio III del ARNr 23S y del espaciador intergénico 16S-23S por PCR y secuenciación se ha empleado para el tipado molecular de la bacteria con fines epidemiológicos.

4.5.4. Precauciones e interpretación de resultados. Quizás el principal problema de las técnicas de PCR es la obtención de falsos positivos (lo que es especialmente delicado cuando se trata de detectar microorganismos que no se pueden confirmar con cultivo) y falsos negativos. Para evitar estos problemas, se deben emplear las normas generales de trabajo en laboratorios de PCR: cambio frecuente de guantes, trabajo secuencial en áreas separadas, material independiente para cada área, irradiación con luz UV del material y las superficies, empleo de uracilo y UNG-D-glicosilasa en la mezcla de reacción de la PCR para evitar contaminación con productos de amplificación de PCR's previas, etc.

Las contaminaciones cruzadas se deben descartar siempre empleando controles negativos (1 cada cinco muestras) que sean procesados en las mismas condiciones de las muestras. No se deben procesar demasiadas muestras conjuntamente,

sobre todo si la extracción de ADN se realiza de forma manual. Cada resultado positivo de una muestra, se debe confirmar realizando con la misma muestra una segunda PCR, que detecte una región diferente del genoma de *T. whipplei*, por lo que en cada laboratorio es conveniente disponer al menos dos técnicas distintas de PCR. El empleo de sistemas de PCR a tiempo real que emplean capilares y sondas de detección, evita abrir y cerrar frecuentemente los tubos y por tanto las contaminaciones cruzadas. Estos problemas son especialmente frecuentes en PCR's tipo nested.

Otra de las causas de falsos positivos de una PCR que se debe descartar, es la obtención de productos de amplificación inespecíficos, que aunque tengan el tamaño adecuado (en el caso de visualización en geles) no correspondan a la diana buscada. La obtención de productos inespecíficos depende de cómo que se haya diseñado y optimizado cada PCR. Para evitarlo, la identidad de cada producto se debe confirmar mediante hibridación con sondas (southern-blot o PCR a tiempo real), secuenciación, cortes con enzimas de restricción, etc. Actualmente el método más usado es la PCR asociada a secuenciación y alineamiento de secuencias en bases de datos públicas como genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los falsos negativos se suelen producir por la presencia en la muestra de inhibidores de la PCR, para descartarlos es conveniente introducir un control interno, analizar varias diluciones de la muestra o bien detectar en paralelo por PCR un gen que debe estar presente siempre en la muestra, como la β -globina humana. Otra causa importante de falsos negativos de la PCR, es el bajo rendimiento en la etapa de extracción del ADN total de la muestra clínica, que puede verse afectado por una toma de muestra y conservación inadecuadas y que se descarta con la introducción del control interno previamente a la etapa de extracción.

En la interpretación de resultados se deben considerar todas las precauciones descritas anteriormente, para dar un resultado como positivo o negativo. Se deben obtener resultados concordantes en el análisis de dos regiones diferentes y si se obtienen resultados discordantes analizar un nuevo fragmento de la muestra (si está disponible).

Recientemente, se han publicado algoritmos para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Whipple considerando los resultados de la tinción de PAS y del análisis por PCR. Hay autores que consideran la PCR como una técnica complementaria del estudio histológico y recomiendan su empleo cuando se sospecha la enfermedad y el estudio histológico es negativo o en muestras del SNC. Otros autores recomiendan realizar conjuntamente las dos técnicas, ya que consideran que la tinción de PAS tiene falsos negativos y no es completamente específica de la enfermedad de Whipple. Si ambas técnicas son positivas se considera el diagnóstico probado. Si sólo uno de los test es positivo, se considera el diagnóstico probable y se debe descartar la enfermedad por análisis de otro tejido (si

está disponible también por serología o análisis inmunohistoquímico). Si sólo la PCR es positiva, se deben analizar 2 regiones de ADN diferentes en la misma muestra o emplear muestras de localizaciones distintas (LCR, líquido articular, adenopatías, etc.). Cuando se establece un diagnóstico de certeza, se debe analizar LCR con PCR incluso en ausencia de manifestaciones neurológicas.

4.5.5. Otros métodos para el diagnóstico de laboratorio. El cultivo de *T. whipplei* y la secuenciación de su genoma completo en laboratorios de investigación, ha facilitado el diseño de técnicas serológicas experimentales y el diseño de medios sintéticos para su cultivo. Un mayor desarrollo de estos métodos quizás permitirá, en un futuro próximo, su empleo en el diagnóstico de la enfermedad de Whipple en laboratorios de microbiología clínica.

Cultivo. Durante años se ha considerado a *T. whipplei* como un microorganismo no cultivable. A pesar de numerosos esfuerzos la bacteria no se pudo cultivar hasta el año 2000, en que se consiguió en medios celulares con líneas de fibroblastos humanos, comprobándose que tiene un tiempo medio de duplicación largo. El cultivo se realiza en medios celulares, la bacteria crece lentamente en líneas de fibroblastos humanos como MRC-5 y HEL en medio mínimo esencial sin antibióticos, con 10% de suero bovino fetal y 2mM de L-glutamina y tras varias semanas de incubación se puede observar un efecto citopático. En las actuales condiciones de cultivo el tiempo medio de duplicación varía entre 32h. y 4 días. El crecimiento de *T. whipplei* se debe asegurar por PCR, tinción de PAS o microscopía electrónica. El cultivo empleando la técnica de shell-vial aumenta el rendimiento. Se ha conseguido crecer la bacteria también en células HeLa y monocitos humanos de sangre periférica desactivados con IL-4. A partir del genoma de *T. whipplei* se ha diseñado un medio sintético para su cultivo en el que crece la bacteria extracelularmente. Sin embargo, por ahora sólo se ha conseguido en laboratorios altamente especializados y aún parece estar lejos su incorporación a los laboratorios de diagnóstico microbiológico.

Serología. Con el cultivo de la bacteria se han producido varios antígenos que permiten la detección serológica de la enfermedad. Se ha desarrollado un test de inmunofluorescencia indirecta mediante la fijación de una monocapa de células infectadas por la bacteria. La presencia de IgG frente a antígenos de *T. whipplei* es frecuente en pacientes sin la enfermedad, lo que puede indicar reacciones cruzadas o como se ha especulado una distribución ubicua del microorganismo. La presencia de IgM correlaciona mejor con la presencia de enfermedad. Sin embargo, por el momento los pocos métodos publicados no tienen suficiente especificidad para su uso diagnóstico.

Microscopía electrónica. Su utilidad se basa en visualizar por microscopía electrónica de transmisión, bacilos con una membrana externa

trilaminar en el interior de macrófagos. Es una técnica laboriosa que necesita equipos y personal muy experimentado y actualmente sólo se realiza en centros de referencia.

Inmunohistología

La posibilidad de obtener anticuerpos mono o policlonales específicos de *T. whipplei* ha permitido el desarrollo de técnicas de hibridación *in situ* (FISH), que permiten detectar la bacteria en secciones de tejido del paciente convenientemente preparadas y mediante microscopía confocal o de fluorescencia. Como en los casos anteriores estas técnicas aún no están disponibles para el diagnóstico.

5. BIBLIOGRAFIA

5.1. ANAPLASMOSIS HUMANA (EHRLICHIOSIS HUMANA GRANULOCÍTICA)

1. Blanco JR, Oteo JA. Human Granulocytic Ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:763-772.
2. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1108-32.
3. Brouqui P, Salvo E, Dumler JS, et al. Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in humans by immunofluorescence assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 8:199-202.
4. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:2145-2165.
5. Edelman DC, Dumler JS. Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. *Mol Diagn* 1996; 1:41-49.
6. Goodman JL, Nelson C, Vitale B, et al. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1996; 334:209-215.
7. Guerrero A, Losada I, De Lucas S, et al. Ehrlichiosis infection prevalence in Spain or cross-reactions. *Med Clin (Barc)* 2001; 116:315.
8. Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:717-722.
9. Oteo JA, Blanco JR, De Artola V, et al. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis* 2000; 6:430-431.
10. Oteo JA, Gil H, Barral M, et al. Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect* 2001; 127:353-358.
11. Petrovec M, Lotrick-Furlan S, Zupank TA, et al. Human disease in Europe caused by granulocytic ehrlichia species. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1556-1559.
12. Portillo A, Santos AS, Santibáñez S, et al. Detection of non-pathogenic variant of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from La Rioja, Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1063:333-336.
13. Walls JJ, Caturegli P, Bakken JS, et al. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using *epank1* genes of *Ehrlichia*

phagocytophila-group ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 2000; 38:354-356.

5.2. INFECCIÓN POR *BARTONELLA* SPP.

1. Avidor B, Kletter Y, Abulafia S et al. Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1924-1930.
2. Birtles RJ, Raoult D. The genera *Afipia* and *Bartonella*. *Bartonella* and *Afipia* species emphasizing *Bartonella henselae*. 1998 vol 1, A.Schmidt, ed. Karger.
3. Blanco JR, Raoult D. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 25:313-320.
4. Breitschwerdt E, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity and zoonotic potential for human infection. *Clin Microb Rev* 2000; 13:428-438.
5. Brenner SA, Rooney JA, Manzwitsch P et al. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: Effects of methods of blood collecting and handling. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 544-547.
6. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S et al. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Disease* 2006; 12:389-394.
7. Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J Med Microbiol* 2002; 51:915-923.
8. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J et al. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1717-1722.
9. Larson AM, Dougherty MJ, Nowowiejski DJ et al. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. *J Clin Microbiol* 1994; 6:1492-1496.
10. Oteo JA, Castilla A, Arosea A, et al. Endocarditis due to *Bartonella* spp. Three new clinical cases and Spanish literature review. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:297-301.
11. Pons I, Sanfeliu I, Quesada M, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:453-457.
12. Tierno PM, Inglima K, Parisi MT. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* bacteremia using Bact/Alert blood culture system. *Am J Clin Pathol* 1995; 104:530-536.
13. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE et al. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *B. henselae* spp. Nov., isolated from blood of a febrile human immunodeficient virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 1992; 30:265-274.

5.3. INFECCIONES POR *RICKETTSIA* SPP.

1. Blanco JR, Oteo JA. Rickettsiosis in Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078:26-33.
2. Fournier P., F. Gourié, P. Brouqui, F. Lucht, and D. Raoult. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1435-1444.
3. Fournier P, Raoult D. Identification of rickettsial isolates at the species level using multi-spacer typing. *BMC Microbiol* 2007; 7:72.
4. Hernández Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:740-743.
5. Jado I, Escudero R, Gil H, et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and

- environmental samples. J Clin Microbiol 2006; 44:4572-4476.
6. Jado I, Oteo JA, Aldámiz M et al. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. Emerg Infect Dis 2007; 13:1405-1407.
 7. Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, et al. Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. J Clin Microbiol 2006; 44:2669-2671.
 8. Oteo JA, Ibarra V, Blanco JR et al. Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. Clin Microbiol Infect 2004; 10:327-331.
 9. Paddock CD, Koss T, Ereemeeva ME et al. Isolation of *Rickettsia akari* from eschars of patients with rickettsialpox. Am J Trop Med Hyg 2006; 75:732-738.
 10. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev 2005; 18:719-756.
 11. Raoult D, Fournier P, Ereemeeva M et al. Naming of rickettsiae and rickettsial diseases. Ann N Y Acad Sci 2005; 1063:1-12
 12. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*OmpB*). Int J Syst Evol Microbiol 2000; 50 Pt 4:1449-1455.
 13. Vitale G, Mansuelo S, Rolain J et al. *Rickettsia massiliae* human isolation. Emerg Infect Dis 2006; 12:174-175.
- #### 5.4. ENFERMEDAD DE WHIPPLE
1. Dutly F, Altwegg M. Whipple's disease and "*Tropheryma whippelii*". Clin Microbiol Rev 2001; 14:561-583.
 2. Fenollar F, Puechal X, Raoult D. Whipple's disease. N Engl J Med 2007; 356:55-66.
 3. Fenollar F, Raoult D. Molecular techniques in Whipple's disease. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1:299-309.
 4. La Scola B, Fenollar F, Fournier PE, et al. Description of *Tropheryma whippelii* gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51(Pt 4):1471-1479.
 5. Marth. T. Whipple's disease. En "Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases". 2005. 6th ed. pp 1306-1310. Elsevier Churchill Livingstone.
 6. Raoult D, Birg ML, La Scola B, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. N Engl J Med 2000; 342:620-625.
 7. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, et al. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. N Engl J Med 1992; 327:293-301.
 8. Whipple GH. A hitherto underscribed disease characterized anatomically by deposits of far and fatty acid in the intestinal and mesenteric lymphatic tissues. Bull Johns Hopkins Hospital 1907;18:382-391.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-01
AISLAMIENTO DE *Anaplasma phagocytophilum* A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE CULTIVO

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es describir la metodología de aislamiento de *A. phagocytophilum* a partir de muestras clínicas. Este procedimiento se lleva a cabo mediante cultivos celulares inoculados con muestras de pacientes en los que se sospecha una Anaplasmosis Humana (AH). Es aplicable a determinadas muestras clínicas que se reciben en los laboratorios clínicos siendo obligatorio disponer de un laboratorio de bioseguridad de nivel 3.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico de AH requiere el cumplimiento de criterios clínicos (síndrome febril, leucopenia, trombocitopenia, aumento de las enzimas hepáticas), antecedente de picadura de garrapata o posibilidad de la misma (ambiente epidemiológico apropiado) y la confirmación mediante pruebas diagnósticas.

A. phagocytophilum, agente causal de la AH, vive en el citoplasma de las células que infecta, agrupada en unas inclusiones denominadas mórulas que se pueden visualizar mediante tinción con colorantes Giemsa o Wright en extensiones de sangre, médula y LCR mediante microscopía convencional. No obstante, la visualización de las mórulas sólo permitiría establecer un diagnóstico de sospecha de AH, ya que también se observan en otras infecciones provocadas por *Ehrlichia-Anaplasma*. Además en la literatura europea estas técnicas tienen escaso rendimiento. El diagnóstico mediante técnicas de biología molecular tiene una baja rentabilidad y las pruebas serológicas disponibles para la detección de anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* tienen la limitación de las reacciones cruzadas, la necesidad, en muchos casos, de un segundo suero en fase de convalecencia para demostrar una seroconversión y la no disposición de antígenos locales (ver PNTs de PCR e Inmunofluorescencia Indirecta de *A. phagocytophilum*). Todos estos factores hacen que el aislamiento de *A. phagocytophilum* en medios de cultivo sea la principal prueba diagnóstica. El gran problema es que no crece en los medios de cultivo habituales, siendo necesarias líneas celulares y un laboratorio de nivel de seguridad 3.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 2004. 10:1108-32.
- Laboratory Biosafety Manual (WHO, 2003).
- Manual de instrucciones de funcionamiento y mantenimiento de equipos del laboratorio (centrifuga, termociclador, estufa, etc.).
- Preparación de medios, reactivos y viales con cultivos celulares.
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Protocolo del laboratorio de verificación y calibración de equipos e instrumentos.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

La muestra más adecuada para el cultivo de *A. phagocytophilum* es la sangre recogida con heparina. Se recogerá según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología" (PNT-RTP-01. 2003). Las muestras se deben recoger en contenedores estériles de un solo uso con cierre hermético y enviarse, a ser posible, el mismo día de la extracción y sin congelar. Si el envío no se va a realizar de manera inmediata, conviene congelar a -80°C hasta su envío, que debe llevarse a cabo en hielo seco para prevenir la descongelación.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En términos generales, el procedimiento utilizado para el procesamiento de estas muestras es el habitual del laboratorio de microbiología. Las muestras deben manejarse como potencialmente peligrosas. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente. Las muestras inaceptables no deben procesarse y el médico debe ser informado inmediatamente. En estos casos, se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra que represente algún interés diagnóstico así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible garantizando de esta forma la viabilidad del patógeno.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Línea celular HL60 (ATCC CCL-240)
- Medio de cultivo: *Minimum essential medium* (MEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) y 2 mM. de L-glutamina
- Tripsina
- Tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,2 estéril.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de flujo laminar vertical de nivel de bioseguridad clase II.
- Centrífuga con adaptadores para viales que alcance una velocidad de 3.000 rpm.
- Estufa convencional.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Micropipetas de varios volúmenes.
- Puntas de micropipeta.
- Pipetas de 5 y 10 ml estériles.
- Frascos de cultivo Falcon de 25 cm².

7. PROCEDIMIENTO

1. Obtención de la capa leucocitaria a partir de la muestra de sangre total con heparina: centrifugar la muestra a 1.000 rpm durante 2-3 min. y recoger el plasma de la zona más próxima a la capa de glóbulos rojos que queda al fondo. Posteriormente, hacer una segunda centrifugación a 3.000 rpm durante 5 min. y recoger lo que se ha sedimentado.
2. Inoculación de la capa leucocitaria en 3 ml de la línea celular HL60 (ajustada a una densidad de 500.000 células/ml).
3. Incubación de las células (densidad de 200.000 a 600.000 células/ml) a 37°C. Dos veces por semana se debe retirar el medio y añadir 5 ml de medio de cultivo fresco.
4. El cultivo puede ser positivo entre los 5 y 12 días después de la inoculación. La identificación de los aislamientos se comprueba mediante la detección de las mórulas teñidas con tinciones de Giemsa o Wright o con técnicas de biología molecular (PCR y secuenciación).

8. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Limitaciones propias de los cultivos celulares, como múltiples contaminaciones o rotura de la monocapa.
2. El cultivo de *A. phagocytophilum*, resulta muy laborioso y se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3, por lo que su realización queda limitada a los laboratorios que cumplan estos requisitos.
3. Existe un gran número de variantes de *A. phagocytophilum*, algunas de ellas descritas en nuestro medio, que no se han podido cultivar en esta línea celular.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Eur J Clin Microbiol Infect 2002; 8:763-772.
2. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Eur J Clin Microbiol Infect 2004; 10:1108-1132.
3. Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1991; 29:2741-2745.
4. Goodman JL, Nelson C, Vitale B, et al. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. N Engl J Med 1996; 334:209-15. Erratum in: N Engl J Med 1996; 335:361.
5. Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, et al. Isolation of *Anaplasma phagocytophilum* strain Ap-variant 1 in a tick-derived cell line. Ann N Y Acad Sci 2006; 1078:541-544.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-02
DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSIS HUMANA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de anaplasmosis humana mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)	PNT-EMG-02	
		Edición 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es detectar anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* a partir de muestras de suero humano mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

2. FUNDAMENTO

La técnica de IFI permite detectar anticuerpos en el suero del paciente, al visualizar, en un microscopio de fluorescencia, la luz emitida por una molécula fluorescente conjugada a un anticuerpo anti-inmunoglobulina G humana que se encuentra unido al complejo antígeno-anticuerpo, formado por la unión de los anticuerpos presentes en el suero del paciente con el antígeno prefijado en un portaobjetos. La técnica tiene lugar en dos etapas: en un primer paso, se enfrenta el suero del paciente, diluido en tampón fosfato salino (PBS) con el antígeno fijado en un portaobjetos. Tras una incubación en determinadas condiciones de humedad y temperatura, que facilitan la unión específica del antígeno-anticuerpo, se realizan unos lavados que eliminarán los anticuerpos no específicos que no se han unido al antígeno. En un segundo paso, se añade un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), este anticuerpo se unirá al anticuerpo que ya se encuentra unido al antígeno. Al observar el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia, la luz incide sobre la FITC emitiendo una luz de color verde manzana que nos permite detectar la presencia de anticuerpos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

La muestra de elección para el diagnóstico de anaplasmosis humana (AH) es el suero. Éste se recoge según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1ª (Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología, PNT-RTP-0, 2003), y se envía en contenedores estériles de un solo uso y con cierre hermético. El suero debe enviarse refrigerado lo antes posible. Si el envío no se va a realizar de manera inmediata, conviene congelarlo a -20°C hasta su envío, el cual deberá llevarse a cabo en hielo seco para prevenir su descongelación.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

En términos generales, el procedimiento utilizado para el procesamiento de estas muestras es el habitual del laboratorio de microbiología. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente. Además de estos casos, no se aceptará suero hemolítico ni hiperlipémico. Las muestras inaceptables no deberán procesarse y el médico deberá ser informado inmediatamente. En estos casos, se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de las muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal que lleva a cabo la manipulación como para la muestra.

Puesto que resulta importante realizar estudios cuantitativos de sueros del mismo paciente a lo largo del tiempo, es fundamental conservar una alícuota congelada a -20°C de cada muestra que se analice para poder realizar en paralelo el estudio comparativo con las diferentes muestras.

5. REACTIVOS, PRODUCTOS, APARATOS Y MATERIAL NECESARIO

5.1. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- **Portaobjetos con celdas de antígeno prefijado:** cada celda contiene células inactivadas e infectadas por *A. phagocytophilum* (Focus Diagnostics).
- **Conjugado de anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas macadas con fluoresceína:** Se encuentra ya preparado comercialmente (varios proveedores) o se puede preparar en el momento de uso (adición de inmunoglobulinas anti-IgG humanas a una dilución 1:100 de azul de evans en PBS).
- **Medio de montaje:** contiene glicerol tamponado con PBS a pH de 7,2.
- **PBS:** un frasco de solución salina tamponada de fosfato en polvo. Se reconstituye con 1 litro de agua destilada (o purificada). La solución reconstituida es tampón a 0,01 M de pH 7,2.

Estos reactivos han de conservarse refrigerados entre 2 y 8°C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico de anaplasmosis humana mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)	PNT-EMG-02	
		Edición 01	Página 3 de 3

5.2. APARATOS

- Estufa.
- Microscopio de fluorescencia.
- Nevera de 2 a 8°C

5.3. MATERIALES

- Tubos de plástico, fondo cónico tipo Eppendorf de 1,5 ml.
- Gradillas.
- Placas de microdilución .
- Micropipetas de varios volúmenes (20 µL, 200 µL, 1000 µL).
- Puntas para micropipetas.
- Vortex.
- Botella Pyrex con tapón de rosca de 1.000 ml para la preparación de PBS, y almacenamiento del tampón sobrante.
- Jarra coplin o frasco lavador para el tampón.
- Cubreobjetos de 20 x 50 mm.
- Cámara húmeda para la incubación de los portas.
- Agua destilada o purificada
- Reloj
- Papel absorbente para secar las láminas
- Controles positivo y negativo. Existen ya comercializados (Focus diagnostics) o bien se utilizan sueros diagnosticados de AH (control positivo) o diagnosticados de otras infecciones (control negativo) disponibles en el laboratorio.

6. PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar la técnica se deben sacar los reactivos de la nevera para que se atemperen.
2. Preparar la dilución de ensayo del suero 1/64 (por ejemplo: 5 µL del suero del paciente en 315 µL de PBS). Si se quiere titular la muestra preparar diluciones seriadas en PBS utilizando la placa de microdiluciones (1/128, 1/256, 1/512, 1/1024...).
3. Preparar un esquema de las celdas del portaobjetos donde aparezca en que posición va a estar situado cada suero del paciente y su dilución correspondiente, así como la posición de los controles.
4. Añadir 25 µL de los sueros, del control negativo y del positivo en las celdas correspondientes.
5. Incubar los portaobjetos en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
6. Retirar los portaobjetos de la cámara húmeda y enjuagar con PBS. A continuación, sumergirlos en una jarra tipo Coplin con PBS 10 minutos.
7. Lavar en agua destilada o purificada y dejar que se sequen al aire.
8. Añadir aproximadamente 25 µL de conjugado a cada celda.
9. Incubar las láminas en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
10. Repetir los pasos de lavado 6 y 7.
11. Poner unas gotas de medio de montaje en la lámina y cubrir con un cubreobjetos de 20 x 50 mm.
12. Examinar las celdas con un aumento final de 400X con un microscopio de fluorescencia equipado correctamente. Leer los portaobjetos el mismo día

que se realiza la prueba para que la fluorescencia sea óptima. Si esto no fuese posible, guardar las láminas en la oscuridad de 2 a 8°C hasta 24 horas.

7. CONTROL DE CALIDAD

En cada serie se deben incluir controles positivos y negativos.

1. En el control positivo se deben observar inclusiones de fluorescencia intensa y brillante de color verde manzana sobre las células que aparecen en un color rojo oscuro.
2. En el control negativo no se debe ver fluorescencia o esta debe tener una reactividad insignificante. La fluorescencia que no empareja la morfología y la distribución del control positivo se considera negativa.

Si los controles no exhiben estos resultados, los resultados de las muestras del paciente deben ser considerados inválidos y la prueba deberá repetirse.

8. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La óptica del microscopio y la condición y el tipo de fuente de luz determinan la intensidad fluorescente total y los títulos finales. En cada determinación se deben leer primero las celdas control para asegurar la interpretación correcta.

Lectura de los portaobjetos:

La fluorescencia se valora de la forma siguiente:

Positiva de 2 a 4+: fluorescencia verde manzana moderada a intensa.

Positiva de 1+: fluorescencia equivalente a la observada en el título final de referencia del control positivo.

Negativa: no hay fluorescencia o es igual a la observada en la celda del control negativo (o menor que la del título final).

Interpretación de resultados de las muestras del paciente:

La inversa de la dilución de suero más alta que exhibe fluorescencia verde manzana (1+) se denomina el título final de suero.

≥1:64: Títulos finales de anticuerpos IgG séricos de ≥1:64: sugieren infección en época indeterminada y pueden ser indicativos de una infección anterior o de una respuesta temprana a una infección reciente.

<1:64: No se han detectado anticuerpos.

Una seroconversión o aumento del título de, al menos, cuatro veces entre dos muestras de suero obtenidas de 1 a 2 semanas después y evaluadas en paralelo junto a los antecedentes epidemiológicos y una clínica compatible permite establecer el diagnóstico de AH.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Brouqui P, Salvo E, Dumler JS, et al. Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in humans by immunofluorescence assay. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 8:199-202.
2. Guerrero A, Losada I, De Lucas S, et al. Ehrlichiosis infection prevalence in Spain or cross-reactions. Med Clin (Barc) 2001; 116:315.

PNT-EMG-03
DETECCIÓN DIRECTA DE *Anaplasma phagocytophilum* EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN GENÓMICA (PCR) Y SECUENCIACIÓN

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR) y secuenciación	PNT-EMG-03	
		Edición 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es describir la metodología de detección de *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente denominado *Ehrlichia phagocytophila*) en muestras clínicas mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional y posterior secuenciación del producto amplificado. Este procedimiento es aplicable a todas las muestras clínicas con sospecha de anaplasmosis que se reciben en los laboratorios de microbiología clínica que realicen diagnóstico molecular. También es aplicable al ADN extraído a partir de cultivos infectados con muestras clínicas (ver el PNT-EMG-01: Aislamiento de *A. phagocytophilum* a partir de muestras clínicas mediante cultivo).

2. FUNDAMENTO

Las técnicas moleculares son un instrumento valioso para el diagnóstico etiológico de anaplasmosis, ya que pueden detectar en poco tiempo el genoma de cualquier patógeno potencial, independientemente de la viabilidad del microorganismo. Estas técnicas se ven menos afectadas que los cultivos por los tratamientos antibióticos previos, aunque también pueden disminuir la sensibilidad. La obtención de los resultados es mucho más rápida en comparación con el cultivo y tienen alta sensibilidad y especificidad. Por el momento, la mayor parte de las técnicas descritas son de desarrollo propio (*in house*), no estando comercializadas. Aunque existe una gran cantidad de dianas descritas, el gen ARNr 16S es una de las más comúnmente utilizadas puesto que está presente en el genogrupo de *A. phagocytophilum* (que incluye las especies anteriormente denominadas *E. phagocytophila*, *Ehrlichia equi* y agente de la ehrlichiosis humana granulocítica (HGE)). Otra diana que ha demostrado gran capacidad de detección es la del gen repetido en múltiples copias *msp2* (*hge-44* o *p44*), que codifica una proteína de superficie inmunodominante de 40-49kDa de *A. phagocytophilum*. Dado que en pacientes que hayan sido picados por garrapatas fuera de Europa se puede adquirir una infección por *Ehrlichia chaffeensis* u otra especie, con estas muestras se pueden utilizar otras dianas que permitirían la amplificación de todas las *Ehrlichiae* (*fD1* y *rP2*).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect 10:1108-1132.
- Laboratory Biosafety Manual (WHO, 2003).
- Manual de instrucciones de funcionamiento y mantenimiento de equipos (centrífuga, baño, termociclador, centrífuga de vacío, fuente y cubetas de electroforesis) del laboratorio.

- Procedimiento del laboratorio sobre Gestión de residuos.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Protocolo del laboratorio de verificación y calibración de equipos e instrumentos.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

La muestra más adecuada para el diagnóstico molecular de *A. phagocytophilum* es la capa leucocitaria obtenida de sangre en fase aguda extraída con EDTA o citrato. Para ello se recomienda centrifugar la muestra a 1.000 rpm durante 2-3 min. y recoger el plasma de la zona más próxima a la capa de glóbulos rojos que queda al fondo. Posteriormente, hacer una segunda centrifugación a 3.000 rpm. durante 5 min. y recoger lo que se ha sedimentado. El procesamiento de la muestra debe realizarse siempre lo más rápidamente posible; ésta puede mantenerse a temperatura ambiente durante las primeras 48 h o congelarse a -20°C si se supera ese tiempo. Se recogerá según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología". PNT-RTP-01. 2003. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles de un solo uso y con cierre hermético.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

En términos generales, el procedimiento utilizado para el procesamiento de estas muestras es el habitual del laboratorio de microbiología. Las muestras deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente. Las muestras inaceptables no deben procesarse y el médico debe ser informado inmediatamente. En estos casos, se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico así como aspectos

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR) y secuenciación	PNT-EMG-03	
		Edición 01	Página 3 de 6

relacionados con su recogida, transporte y conservación.

3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.

4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible garantizando de esta forma la estabilidad del ADN del patógeno.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizará el kit "QIAamp DNA Blood" (QIAGEN, Hilden, Germany), para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

5.2. REACTIVOS PARA LA AMPLIFICACIÓN (volumen de reacción: 50 µL).

Concentración final en la reacción:

- 1× de tampón de reacción NH₄
- 3 mM de MgCl₂ (en ocasiones, puede recurrirse a optimizar la cantidad de MgCl₂, modificando su concentración en un rango entre 1-6 mM).
- 0,2 mM de la mezcla de 4 dinucleótidos trifosfato (dNTPs) (varios proveedores).
- Oligonucleótidos 50 pmol de cada uno de ellos:
Para el gen *rrs* de *A. phagocytophilum*:
ge9f: 5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'
ge10r: 5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3'

Para el gen *msp2* de *A. phagocytophilum*:
msp2-3F: 5'-CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG-3'
msp2-3R: 5'-GCCAGTAACAACATCATAAGC-3'

Para el gen *rrs* de todas las *Ehrlichiae*:
fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
rP2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

- 1,5 U *Taq* polimerasa (varios proveedores).

5.3. REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS

- Tampón TBE 1× (Tris-HCl 100 mM, ácido bórico 90 mM, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH 8,3).
- Tampón de carga para electroforesis (azul de bromofenol 0,25%, cianol xileno FF 0,25%, glicerol 30%).
- Marcador de tamaño molecular de intervalo 100-1.000 pb (varios proveedores).
- Agarosa "Low Melting" (varios proveedores).
- Bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Agua destilada.

5.4. REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Se utilizará el kit "QIAquick gel extraction" (QIAGEN).

5.5. REACTIVOS PARA LA SECUENCIACIÓN

Se utilizará el kit "BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction" Applied Biosystems (USA).

6. APARATOS Y MATERIALES

6.1. INSTRUMENTAL

- Cabina de Seguridad Biológica de clase IIA.
- Centrífuga de sobremesa con rotor oscilante para centrifugar tubos de sangre
- Microcentrífuga para tubos de fondo tipo Eppendorf y rotor angular, con velocidad de rotación de 16.000 × g.
- Agitador orbital tipo vortex.
- Bloques de calor seco o termobloques.
- Termociclador.
- Balanza de precisión.
- Espectrofotómetro.
- Microondas para fundir la agarosa.
- Cubetas de electroforesis.
- Fuente de alimentación para electroforesis convencional.
- Transiluminador de luz U.V.
- Equipo fotográfico o de captación de imágenes.
- Nevera (2-8°C).
- Congelador (-20°C).

6.2. MATERIALES

- Tubos tipo Eppendorf de 1,5 y 0,2 ml.
- Gradillas de diferentes formatos.
- Gradillas congeladora (-20°C) y refrigeradora (2-8°C).
- Cajas de congelación para tubos Eppendorf.
- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Puntas de micropipeta estériles provistas de filtro a prueba de aerosoles.
- Tubo Vacutainer con anticoagulante EDTA o citrato para extracción de la sangre.
- Botellas esterilizadas mediante calor seco para preparar tampones y geles de agarosa.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DEL ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras se utilizará el "kit QIAamp DNA Blood" para sangre siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2. AMPLIFICACIÓN.

7.2.1. Controles necesarios:

- Control positivo: ADN de *A. phagocytophilum* a una dilución límite de detección para comprobar la eficacia de la amplificación de la PCR.
- Control negativo de extracción: extraer una muestra de agua en las mismas condiciones y a la vez que se extraen las muestras para analizar. Este control permite comprobar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de extracción.
- Control negativo de PCR sin cebadores.
- Control negativo de PCR sin ADN: Se amplifica una muestra del agua estéril.

Estos dos controles últimos permiten comprobar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de amplificación.

- Para confirmar que el ADN se ha extraído correctamente y que no existen inhibidores en la muestra que impidan el proceso de amplificación,

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección directa de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR) y secuenciación	PNT-EMG-03	
		Edición 01	Página 4 de 6

debe amplificarse en cada una de las muestras un control interno, por ejemplo el de la betaglobina que amplifica un fragmento de 150 pb (cebadores: sense-CATGCCTCTTTGCACCATTC y antisense-TGGTAGCTGGATTGTAGCTG).

7.2.2. Condiciones de la PCR del gen *rrs* de *A. phagocytophilum*:

- Un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 min.
- 35 ciclos de los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización a 94°C durante 30 s.
 2. Hibridación a 55°C durante 30 s.
 3. Extensión a 72°C durante 1 min.
- Un ciclo para completar la extensión de los productos de PCR. Consiste en una incubación a 72°C durante 5 min.

Condiciones de la PCR del gen *msp2* de *A. phagocytophilum*:

- Un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 min.
- 40 ciclos de los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización a 94°C durante 30 s.
 2. Hibridación a 56°C durante 30 s.
 3. Extensión a 72°C durante 30 s.
- Un ciclo para completar la extensión de los productos de PCR. Consiste en una incubación a 72°C durante 1 min.

Condiciones de la PCR del gen *rrs* de *Ehrlichiae*:

- Un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 15 min.
- 40 ciclos de los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización a 94°C durante 30 s.
 2. Hibridación a 53°C durante 30 s.
 3. Extensión a 72°C durante 90 s.
- Un ciclo para completar la extensión de los productos de PCR. Consiste en una incubación a 72°C durante 3 min.

7.3. ELECTROFORESIS.

- Preparar el gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE 1x.
- Cargar el gel, añadiendo previamente el tampón de carga a las muestras. Utilizar uno de los pocillos para cargar el marcador de tamaño molecular.
- Conectar la fuente de electroforesis de manera que no se sobrepasen 5 V/cm (considerando la distancia más corta entre los electrodos). Lo habitual es que se conecte a 100-150 V.
- Desconectar la fuente cuando el colorante azul de bromofenol esté aproximadamente a la mitad del gel (aproximadamente 1 hora). Para visualizar los amplicones, depositar el gel sobre un transiluminador con luz ultravioleta en un lugar oscuro.

7.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

Para validar los resultados del ensayo, en la carrera del control negativo no debe aparecer ninguna banda y en la del control positivo debe aparecer una banda de 919 pares de bases (pb) para el gen *rrs* y una banda de 334pb para *msp2* de *A. phagocytophilum* y de 1500 pb para los cebadores universales. Para

poder interpretar si ha habido amplificación en las muestras, debe aparecer en cada una de ellas la banda correspondiente al amplificado de control interno.

7.5. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO Y SECUENCIACIÓN

El producto amplificado se purifica cortando la banda a partir del gel de agarosa y utilizando el kit QUIAquick gel extraction kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se somete a una nueva amplificación con concentraciones limitantes de dideoxinucleótidos marcados (secuenciación unidireccional). Se utiliza el kit "BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction" con los mismos oligonucleótidos que los usados en la fase de amplificación, a razón de 3 pmol por reacción de secuencia. Mediante el empleo de un secuenciador automático los amplificados se resuelven mediante electroforesis capilar, obteniéndose un cromatograma con la secuencia de bases. Finalmente, la secuencia de ácidos nucleicos se edita y se compara, mediante el empleo de un software específico, programas de alineamiento utilizando secuencias de referencia o bien mediante comparación *on line* con secuencias de bases de datos (programa Blast) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de PCR se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo. Los datos de secuencia permiten identificar las posibles mutaciones puntuales de las diferentes variantes de *A. phagocytophilum* que parecen tener diferente carácter patógeno o no patógeno para humanos.

Cuando se notifica un resultado de PCR negativo se debe tener en cuenta que, en ocasiones, la carga bacteriana en algunas muestras suele ser muy baja y por tanto los métodos moleculares pueden no ser suficientemente sensibles, por lo que un resultado negativo no descarta una infección.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente son las siguientes:

- Personal del área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras, rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo, realización de la técnica, lectura y registro de resultados, archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, adopción de medidas correctoras en el caso de que se hayan cometido errores, firma del informe de resultados.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR) y secuenciación	PNT-EMG-03	
		Edición 01	Página 5 de 6

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En el caso de la amplificación del gen *rrs*, la secuenciación del producto amplificado permite diferenciar variantes de *A. phagocytophilum*. Existen otros muchos genes comúnmente analizados como los genes *ankA* (*epank1*), *groESL*, *rpoB* o *gltA* (véase tabla 1).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Si bien la PCR es una prueba ideal para el diagnóstico de estas infecciones, existen algunas desventajas en comparación con el cultivo, como son la limitación para realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos y la imposibilidad de coleccionar los aislados para futuras investigaciones. Se deben establecer algunos parámetros antes de incorporar estas pruebas a los protocolos de diagnóstico clínico de los hospitales, como por ejemplo definir el control interno de inhibición, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de la técnica.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10:1108-1132.
2. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 1994; 32:589-595.
3. Dumler JS, Brouqui P. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:559-569.
4. Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, et al. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. J Clin Microbiol 2001; 39:3031-3039.
5. Massung RF, Mauel MJ, Owens JH, et al. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. Emerg Infect Dis 2002; 8:467-472.
6. Massung RF, Priestley RA, Miller N, et al. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. J Infect Dis 2003; 188:1757-1763.
7. Portillo A, Santos AS, Santibáñez S, et al. Detection of a non-pathogenic variant of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from La Rioja, Spain. Ann N Y Acad Sci 2005; 1063:333-336.
8. Stuen S, Van de Pol I, Bergström K, et al. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. J Clin Microbiol 2002; 40:3192-3197.
9. Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. J Clin Microbiol 1997; 35:2087-2092.
10. Taillardat-Bisch AV, Raoult D, Drancourt M. RNA polymerase beta-subunit-based phylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53:455-458.
11. Walls JJ, Caturegli P, Bakken JS, et al. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using *epank1* genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group ehrlichiae. J Clin Microbiol 2000; 38:354-356.
12. Zeidner NS, Burkot TR, Massung R. Transmission of the agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: Evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. J Infect Dis 2000; 182:616-619.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR) y secuenciación	PNT-EMG-03	
		Edición 01	Página 6 de 6

Tabla 1. Genes utilizados como diana para la detección de *A. phagocytophilum* mediante PCR, secuencia de cebadores y tamaño del fragmento amplificado en cada caso.

Gen	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores (5'→ 3')	Fragmento (pb) Referencia
<i>ankA (epanK1)</i>	LA 6	f: GAGAGA TGCTTATGGTAA GAC	(444) Walls et al., 2000
	LA 1	r: CGTTCAGCCATCATTGTGAC	
<i>GroESL *</i>	HS1 HS6	f: TGGGCTGGTA (A/C) TGAAAT r: CCICCIIGGIACIA (C/T) ACCTTC	(1343) Sumner et al, 1997
	HS43 HS45	f: AT (A/T) GC (A/T) AA (G/A) GAAGCATAGTC r : ACTTCACG (C/T) (C/T) TCATAGAC	(480) Sumner et al., 1997
<i>rpoB</i>	D420GL R1820AGB	f: CTIGAAGAIGCIGGIGC r: GACCTTCIGGIGTTTC (A/G) AIIGGAC	(1230) Taillardat-Bisch et al., 2003
	D1760AGB R4060AGB	f: GGITTIGAIGTICGIGACG r: GAITTAACIGTIAICATTTCC	(2650) Taillardat-Bisch et al., 2003
<i>gltA</i>	HG-M28F HG1257R	f: <i>GTAATAAATTGTATTATCAGAG</i> r: AATACGTGAGTTTGAAACCA	(1236) Inokuma et al., 2001

f: forward; r: reverse.

* PCR anidada

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-04
DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR *Bartonella* spp. A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS
MEDIANTE CULTIVO

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico de las infecciones por <i>Bartonella</i> spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-04	
		Edición 01	Página 2 de 3

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procesamiento de muestras para el diagnóstico microbiológico de la infección por *Bartonella* spp. mediante cultivo bacteriológico. Se documentan los tipos de muestra, su procesamiento en el laboratorio, las condiciones de cultivo y los métodos de identificación.

2. FUNDAMENTO

Las bartonellas son bacterias gramnegativas, pleomórficas y de difícil aislamiento. Están relacionadas principalmente con la enfermedad por arañazo de gato, angiomas bacilar, peliosis hepática, bacteriemias, uveítis, endocarditis entre otras manifestaciones clínicas. Su aislamiento en cultivo, además de su utilidad para el diagnóstico microbiológico de la infección, posibilita el tipado de cepas para fines epidemiológicos y para estudios de sensibilidad.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Gestión de residuos.
- Normas de bioseguridad: la situación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos regulados por el Real decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la orden de 25 de marzo de 1998.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.

4. MUESTRAS

4.1 PETICION

La petición que acompaña a cada muestra debe estar estrictamente cumplimentada y en ella deberá constar el número de historia, nombre, edad, servicio de procedencia, tipo de muestra (de forma muy específica), tratamiento previo, así como el diagnóstico clínico.

4.2 RECOGIDA DE LA MUESTRA.

Las muestras más utilizadas para el cultivo microbiológico de *Bartonella* spp. son las biopsias (ganglios o adenopatías, válvulas cardíacas, piel, etc.) y el hemocultivo (pacientes inmunodeprimidos o con sospecha de endocarditis).

4.3 TRANSPORTE Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS

Las biopsias deberán obtenerse de manera aséptica para poder evitar posibles contaminaciones y se transportarán al laboratorio con agua destilada lo más rápidamente posible. El cultivo se realizará inmediatamente o se conservarán a -80°C para su procesamiento posterior. Los cultivos de sangre se inocularán directamente en una botella de hemocultivo para ser procesados en un sistema automático durante al menos 21 días. También se puede cultivar la sangre directamente en medios sólidos, siempre que se realice el proceso de lisis de

los hematíes, para ello se recogerá la sangre en un tubo con EDTA y se congelará a -80°C durante al menos 24 horas antes de sembrarse en el medio sólido.

4.4 CRITERIOS DE RECHAZO

Cualquier error en la identificación de la muestra: etiquetado erróneo o inadecuado, falta de información; mala conservación (temperatura inapropiada, muestra en medios incorrectos); muestras con aspecto de mala conservación (biopsias secas). Todas estas incidencias deben ser comunicadas al clínico, indicando el no procesamiento de las muestras y los posibles errores en la interpretación de resultados si se realiza.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO

Agar Columbia con 5% de sangre de cordero, Agar chocolate con 1% de isovitalax y botellas de hemocultivos (del sistema que cada laboratorio utilice). Todos los medios deben estar conservados entre $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta la fecha de caducidad indicada.

5.2 REACTIVOS

Colorantes para tinción Gram, reactivos para la realización de la oxidasa, catalasa.

6. APARATOS Y MATERIALES

Neveras, cabina de seguridad biológica, congelador de -80°C , asas de siembra, morteros, guantes, mechero incinerador o Bunsen, centrifugas, portaobjetos.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 PREPARACION E INOCULACION DE LA MUESTRA

Las biopsias se trituran en un mortero con 0,5 ml de agua destilada, y posteriormente se inoculan de 2 a 4 gotas del triturado en las placas de cultivo (agar sangre y agar chocolate) y se realizan estrías con el asa por toda la superficie de la placa. Las muestras de sangre con EDTA después de un proceso de congelación a -80°C durante al menos 24 horas se sembrarán en medios sólidos. Como alternativa para la lisis de la sangre se puede utilizar el método *Isolator™ blood-lysis tube*.

La sangre inoculada en botellas para su procesamiento automatizado se incubará al menos 21 días, una vez transcurridos se centrifugará el contenido del hemocultivo a 2000-2500 rpm durante 15 min y se sembrará el sedimento en medios sólidos.

También pueden utilizarse cultivos celulares mediante la técnica de *shell vial*. En este caso, las muestras de sangre heparinizada o tejido se diluyen en medio líquido, MEM o RPMI con suero bovino fetal, se someten a un proceso de centrifugación sobre capas de líneas celulares y se incuban durante un periodo de 15-30 días. Estos cultivos se revelan mediante una tinción de Giménez, el sobrenadante

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las infecciones por <i>Bartonella</i> spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-04	
		Edición 01	Página 3 de 3

se guarda para poder inocular en posteriores cultivos celulares en el caso que se observe *Bartonella* spp. o para poder realizar una PCR.

7.2 CONDICIONES DE INCUBACIÓN

El crecimiento del género *Bartonella* (excepto *B. bacilliformis*) es muy lento. Las muestras deberán incubarse a 35-37°C con un 5% de CO₂ (excepto *B. bacilliformis* que solamente crece a 28-30°C).

El tiempo mínimo de incubación varía dependiendo del tipo de cultivo de que se trate. Si es un cultivo primario o una muestra directa de paciente, se deberá incubar durante un periodo mínimo de 2 meses. Si por el contrario se trata de subcultivos de *Bartonella* spp. (previamente aislados), son necesarios solamente de 3-10 días de incubación. La larga incubación de las muestras en medios húmedos aumenta mucho el riesgo de contaminación por hongos y por bacterias de crecimiento rápido. Este problema se minimiza adicionando antimicóticos como anfotericina B al cultivo o más fácilmente mediante el cierre de la placa de cultivo con parafilm después de transcurridas las primeras 24 horas de incubación.

7.3 OBSERVACION DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO

Los cultivos se examinan una vez a la semana. En cultivos primarios a partir de las 3 semanas se empieza a observar crecimiento. Las colonias tienen un aspecto gris-amarillento, son rugosas y enclavadas en el medio. Para su identificación se debe realizar tinción de Gram, oxidasa y catalasa. La identificación de género y especie se realiza mediante técnicas de PCR.

7.4 SUBCULTIVO DEL MICROORGANISMO

A partir de una colonia sospechosa de *Bartonella* spp. se realizará un subcultivo en agar sangre. Este se incubará en las mismas condiciones anteriormente descritas. El crecimiento de los subcultivos es más rápido, a la semana ya se pueden observar las colonias que con posteriores siembras van perdiendo rugosidad y adherencia al medio.

7.5 ALMACENAMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS

Las cepas aisladas se congelaran a -80°C en un medio nutritivo tipo caldo de *Brucella* con un 10% de glicerol.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

Se considera positivo el cultivo para *Bartonella* spp. cuando se observan en el medio pequeñas colonias entre 0,3-2,0 µm, de color blanco-amarillento y aspecto rugoso, siempre muy adheridas al medio, incrustadas en la superficie y difíciles de arrastrar con un asa de siembra y que por las técnicas de identificación se confirme que se trata de *Bartonella* spp.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de la técnica. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los mismos.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Debido a que la sensibilidad del cultivo bacteriano es baja, un resultado negativo no descarta la infección por este microorganismo. El correcto diagnóstico de infección por *Bartonella* spp. Debe basarse en criterios clínicos, serológicos y microbiológicos (cultivo y PCR).

11. BIBLIOGRAFIA

1. Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. Clin Lab Med 2002; 22:937-962.
2. Brenner SA, Rooney JA, Manzwetsch P et al. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: Effects of methods of blood collecting and handling. J Clin Microbiol 1997; 35:544-547.
3. Tierno PM, Inglima K, Parisi MT. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* bacteremia using Bact/Alert blood culture system. Am J Clin Pathol 1995; 104:530-536.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-05
DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR *Bartonella* spp. MEDIANTE SEROLOGIA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las infecciones por <i>Bartonella</i> spp. mediante serología	PNT-EMG-05	
		Edición 01	Página 2 de 3

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento de muestras para el diagnóstico serológico de la infección por *Bartonella* spp.

Este documento es de consulta para el personal del laboratorio encargado de su realización e interpretación.

2. FUNDAMENTO

El método serológico se basa en la detección de anticuerpos IgG e IgM específicos frente a *B. henselae* y *B. quintana*. Este método puede utilizarse para el diagnóstico de la infección, el posible seguimiento de la enfermedad, así como para estudios de seroprevalencia. La técnica más utilizada actualmente es la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Normas de bioseguridad: la situación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos regulados por el Real decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la orden de 25 de marzo de 1998.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.

4. MUESTRAS

4.1 PETICION

La petición que acompaña a cada muestra debe estar estrictamente cumplimentada y en ella deberá constar el número de historia, nombre, edad, servicio de procedencia, tratamiento previo, así como el diagnóstico clínico.

4.2 RECOGIDA DE LA MUESTRA

La muestra adecuada para la determinación serológica de anticuerpos es el suero y si no es posible se puede utilizar plasma.

Las muestras de sangre se centrifugan a 1000-1500 g durante 10 minutos. Se conservarán a 4 °C un máximo de 72 h. Si se demora más la realización de la técnica se congelarán a -30°C. Las muestras hemolizadas o hiperlipémicas pueden dar problemas de interpretación.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los reactivos utilizados son comercializados, por lo que el manejo y la conservación de los reactivos se ajustarán a las instrucciones del fabricante.

6. APARATOS Y MATERIAL

Estufa, congeladores, neveras, material fungible (tubos, puntas pipetas, etc) pipetas calibradas, recipientes de lavado y microscopio de fluorescencia.

7. PROCEDIMIENTO

Cada laboratorio debe describir detalladamente los pasos a seguir para realizar la técnica, desde la congelación de los sueros al atemperamiento de los

reactivos. Se debe seguir en todo momento las instrucciones del fabricante.

Existen sistemas comercializados para la determinación de anticuerpos tipo IgG e IgM. Como ejemplo se recomienda realizar una determinación de cribaje a una dilución del suero de 1/64 para la IgG y 1/20 para la IgM. Si ésta es positiva se deberán realizar más diluciones dobles del suero.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

Para la aceptación de los resultados, es imprescindible que los controles incorporados a la técnica sean correctos. En el caso en que un paciente tenga más de un suero, estos se ensayarán en paralelo para minimizar la variabilidad interensayos.

Las muestras son negativas cuando hay ausencia de fluorescencia y son positivas cuando se observan bacterias o cúmulos de bacterias fluorescentes en las células. Las muestras positivas deben diluirse y se considerará el título del suero la dilución más alta que presenta reacción positiva.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de la técnica. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los mismos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Las muestras obtenidas al inicio de la infección pueden ser negativas, por este motivo siempre que se sospecha una infección por *Bartonella* spp. es importante estudiar dos muestras recogidas en un intervalo de 15-21 días en paralelo (fase aguda y convaleciente) y observar un incremento o seroconversión de los títulos de anticuerpos (aumento de dos títulos).

Debido a que la seroprevalencia de anticuerpos frente a la *Bartonella* spp. en la población sana no es despreciable, se ha tenido en cuenta como valor predictivo de infección unos títulos superiores a 1/128 en casos de enfermedad por arañazo de gato, mientras que en los casos de endocarditis los títulos deben ser $\geq 1/800$.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se debe tener en cuenta que existen reacciones cruzadas entre las especies de *Bartonella* spp. y que mediante la serología es difícil determinar la especie causante de la infección. En algunos casos cuando se observa un título superior en dos diluciones de alguna de ellas se podría considerar a esta como responsable de la infección.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. Clin Lab Med 2002; 22:937-962.
2. Sander A, Posselt M, Oberle K et al. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las infecciones por <i>Bartonella spp.</i> mediante serología	PNT-EMG-05	
		Edición 01	Página 3 de 3

scratch disease and in healthy controls: Evaluation and comparison of two commercial serological test. Clin Diag Lab Immunol 1998; 5:486-490.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-06
DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR *Bartonella* spp. MEDIANTE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA Y SECUENCIACIÓN

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las infecciones por <i>Bartonella</i> spp. Mediante amplificación genómica y secuenciación	PNT-EMG-06	
		Edición 01	Página 2 de 3

1. PROPOSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procesamiento de muestras para el diagnóstico mediante técnicas de PCR de la infección por *Bartonella* spp.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas moleculares se basan en la detección de ADN específico de *Bartonella* spp. Este método puede utilizarse para el diagnóstico de la infección en muestras biológicas (biopias o sangre) y para la identificación de las cepas aisladas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Gestión de residuos
- Normas de bioseguridad: la situación del personal y las medidas a tomar frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos regulados por el Real decreto (RD) 664/97 y la adaptación contenida en la orden de 25 de marzo de 1998.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.

4. MUESTRAS

4.1 PETICION

La petición que acompaña a cada muestra debe estar estrictamente cumplimentada y en ella deberá constar el número de historia, nombre, edad, servicio de procedencia, tratamiento previo, así como el diagnóstico clínico.

4.2 RECOGIDA DE LA MUESTRA

Las determinaciones se pueden realizar en biopsias (piel, válvulas, ganglios), o en sangre (con EDTA), las muestras se mantendrán congeladas a – 80°C hasta la realización de la técnica.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los reactivos para la extracción de ADN, la realización de la PCR y purificación del producto para una posterior secuenciación se encuentran actualmente comercializados, por lo que el manejo y la conservación de los reactivos se ajustarán a las instrucciones del fabricante. Los iniciadores para la detección de *Bartonella* spp. son variados dependiendo de las publicaciones consultadas. No existe en el mercado español un reactivo comercializado de amplificación para este microorganismo. Los productos utilizados para la realización del gel de agarosa (agarosa en polvo, bromuro de etidio, TBE) se conservan a temperatura ambiente y los controles de peso molecular en el congelador de –80°C.

6. APARATOS Y MATERIALES

Congeladores, neveras, microondas, balanzas, material fungible para realizar la PCR, pipetas calibradas, termociclador, secuenciador, fuente de corriente, bateas para correr los geles de agarosa.

7. PROCEDIMIENTO

Cada laboratorio debe describir detalladamente los pasos a seguir para realizar cada fase de este procedimiento, desde la congelación de las muestras, el atemperamiento de los reactivos, el proceso de extracción del ADN, el proceso de amplificación de ADN, la preparación de geles de agarosa y la secuenciación. En todos estos aspectos se deben seguir las recomendaciones de los fabricantes, ya que en la mayoría de los casos se trata de sistemas comercializados (ver apartado 2.3.4. del documento científico de este procedimiento).

La técnica de PCR es útil para el diagnóstico de la infección aplicada a muestras clínicas y para la identificación de cepas. La metodología a seguir en ambos es la misma excepto en el proceso de extracción de ADN que dependerá del tipo de muestra.

Para la determinación del género *Bartonella* una de las secuencias más útiles es BhCS.781p y BhCS.1137n, que corresponden a un fragmento del gen de la citrato sintasa (*gltA*) de *Bartonella* spp. Para la diferenciación de las especies existe aún más variedad de secuencias, da buen resultado utilizar los iniciadores complementarios de la región intergénica del 16S-23S ARNr. Una vez realizada la PCR si es positiva para el género *Bartonella*, se puede deducir la especie mediante su visualización en el gel de agarosa y confirmar el resultado mediante la secuenciación.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

Para la aceptación de los resultados, es imprescindible que los controles incorporados a la técnica sean correctos. Siempre se utilizará un control negativo (para evidenciar contaminación de cualquier reactivo) y un control positivo para comprobar que la reacción de amplificación ha tenido lugar. Las muestras son negativas cuando no existe amplificación de ADN para el microorganismo que se pretende detectar y por tanto no se observa ninguna banda en el gel de agarosa, y son positivas cuando este ADN se amplifica y se puede observar una banda a la altura del gel esperada. Siempre se debe utilizar un marcador de pesos moleculares para comprobar el tamaño de la banda.

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos de laboratorio serán los responsables de la realización de la técnica. El facultativo tendrá la responsabilidad de la interpretación de los resultados y la validación de los mismos.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación de esta técnica es la dificultad de disponer de muestras adecuadas, como válvulas cardíacas para el diagnóstico de endocarditis o biopsias. También al tratarse de

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las infecciones por <i>Bartonella</i> spp. Mediante amplificación genómica y secuenciación	PNT-EMG-06	
		Edición 01	Página 3 de 3

técnicas manuales que se han de optimizar resulta difícil su incorporación al laboratorio de rutina, con lo cual se suelen realizar en centros especializados.

Los resultados de las técnicas moleculares son buenos cuando se aplican a la identificación de cepas y muestras de biopsias, pero no así en muestras de sangre que presentan mayores problemas en su interpretación.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. Clin Lab Med 2002; 22:937-962.
2. Avidor B, Kletter Y, Abulafia S, et al. Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach. J Clin Microbiol 1997; 35:1924-1930.
3. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, et al. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. J Clin Microbiol 2000; 38:1717-1722.
4. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, et al. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *B. henselae* spp. nov., isolated from blood of a febrile human immunodeficient virus-positive patient. J Clin Microbiol 1992; 30:265-274.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-07
 AISLAMIENTO DE *Rickettsia* spp. A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE CULTIVO

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Aislamiento de <i>Rickettsia</i> spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-07	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es describir la metodología de aislamiento de rickettsias a partir de muestras clínicas. Este procedimiento se lleva a cabo mediante cultivos celulares inoculados con muestras de pacientes en los que se sospecha una rickettsiosis. Es aplicable a determinadas muestras clínicas que se reciben en los laboratorios clínicos siendo obligatorio disponer de un laboratorio de bioseguridad de nivel 3.

2. FUNDAMENTO

El cultivo es la técnica diagnóstica más específica, además de ser fundamental para la obtención de antígenos y para estudiar la sensibilidad a los antibióticos. Sin embargo, el aislamiento de rickettsias mediante cultivo celular convencional a partir de una muestra procedente de un paciente con rickettsiosis es un proceso muy laborioso, poco sensible y tiene el inconveniente de retrasar la emisión de los resultados. Cuando crece una rickettsia el efecto citopático no siempre tiene lugar y, cuando se produce, no es específico de especie. Además, aunque puede aparecer a las 24-48 h post- inoculación, generalmente se necesitan varios días para su desarrollo. El cultivo se puede acelerar si se inocula la muestra sobre una monocapa de células susceptibles previamente crecidas sobre un portaobjetos circular (*shell vial*), seguida de una centrifugación. Después de 5-7 días de incubación se puede detectar la presencia de la bacteria mediante la tinción de Giménez, inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos específicos o bien mediante técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Para la identificación de la especie de rickettsia aislada, se precisa la secuenciación de una diana específica de especie.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Laboratory Biosafety Manual (WHO, 2003).
- Manual de instrucciones de funcionamiento y mantenimiento de equipos del laboratorio (centrífuga, termociclador, estufa, etc.).
- Preparación de medios, reactivos y viales con cultivos celulares.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.
- Protocolo del laboratorio de verificación y calibración de equipos e instrumentos.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

La muestra más adecuada para el cultivo de rickettsias es la sangre recogida con citrato o heparina. Se recogerá según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología" (PNT-RTP-01. 2003). Las muestras se deben recoger en contenedores estériles de un solo uso con cierre hermético y enviarse, a ser posible, el mismo día de la extracción y sin congelar. Si el envío no se va a realizar de manera inmediata, conviene congelar a -80°C hasta su envío, que debe llevarse a cabo en hielo seco para prevenir la descongelación.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En términos generales, el procedimiento utilizado para el procesamiento de estas muestras es el habitual del laboratorio de microbiología. Hay que tener en cuenta que la bacteriemia durante una rickettsiosis es de menor intensidad que en el caso de otras infecciones, lo que obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo.

Las muestras deben manejarse como potencialmente peligrosas. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente. Las muestras inaceptables no deben procesarse y el médico debe ser informado inmediatamente. En estos casos, se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra que represente algún interés diagnóstico así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.
4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible garantizando de esta forma la viabilidad del patógeno.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. CULTIVOS CELULARES

Viales de plástico de fondo plano de 15 mm de diámetro externo (5 ml de capacidad) con tapón,

Servicio de Microbiología Hospital	Aislamiento de <i>Rickettsia</i> spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-07	
		Edición 01	Página 3 de 4

conteniendo una monocapa confluyente de células Vero formada sobre un cubreobjetos redondo de 12 mm de diámetro. Estos viales se preparan normalmente en el propio laboratorio (al menos 24 horas antes), a razón de 50.000 células/ml, aproximadamente. También serán aceptables los cultivos *shell vial* de procedencia comercial y calidad controlada por el fabricante y el laboratorio.

5.2. REACTIVOS

- Células Vero (ATCC CCL-81).
- Medio MEM (*Minimum Essential Medium*), (varios proveedores).
- Suero bovino fetal (varios proveedores).
- L-glutamina (varios proveedores).
- Aminoácidos no esenciales (varios proveedores).
- Medio de cultivo: Medio MEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (concentración final, CF), 2 mM de L-glutamina (CF) y 0,2% CF de aminoácidos no esenciales.
- Tripsina (varios proveedores).
- Tripsina-verseno: Tripsina al 0,25 % CF en PBS con 1 mM CF de EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético).
- Tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,2, estéril. Puede ser de procedencia comercial, (varios proveedores).
- Azul tripán (varios proveedores).

6. APARATOS Y MATERIAL NECESARIOS

6.1. INSTRUMENTAL

- Cabina de flujo laminar vertical de nivel de bioseguridad clase II.
- Centrífuga con adaptadores para viales que alcance una velocidad de $4.000 \times g$.
- Estufa convencional.
- Microscopio invertido, dotado de objetivos de 10, 20 y 40x.
- Cámara hematocimétrica.

6.2. MATERIALES

- Pipetas Pasteur estériles.
- Micropipetas de varios volúmenes.
- Puntas de micropipeta.
- Pipetas de 5 y 10 ml estériles.
- Pipetus.
- Viales estériles para *shell vial*.
- Cubreobjetos circulares de vidrio de 12 mm, estériles.
- Frascos de cultivo Falcon de 25 cm^2 (varios proveedores).

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CULTIVOS CELULARES: PREPARACIÓN DE VIALES *shell vial*

- Lavar las células eliminando el medio de cultivo y añadiendo 5 ml de solución de PBS estéril en el frasco Falcon que contiene la monocapa de células Vero.

- Tripsinizar las células añadiendo 2-3 ml de solución de tripsina-verseno, incubar a 37°C unos segundos.
- Cuando las células empiecen a desprenderse, parar la tripsinización añadiendo 5-10 ml de medio de cultivo.
- Mediante una pipeta aspirar y expulsar el medio, haciendo que el líquido golpee la superficie del cultivo, con el fin de desprender las células y lograr una suspensión homogénea. Evitar, en la medida de lo posible, la formación de espuma.
- Contar las células viables en cámara hematocimétrica con azul tripán (son viables las que no permiten la entrada del colorante).
- Ajustar la suspensión a 50.000 células/ml, añadiendo medio de cultivo.
- Repartir en los viales *shell vial*, a razón de 1 ml por tubo.
- Colocar los tubos en la estufa a 37°C e incubar hasta que se forme una monocapa confluyente.
- Al día siguiente, visualizar los tubos al microscopio invertido para ver si la monocapa está bien formada y no hay contaminación.

7.2. INOCULACIÓN DE LOS VIALES

- Rotular los viales con el número de laboratorio y la fecha de inoculación.
- Antes de inocular, eliminar el medio MEM de los viales.
- Se inoculan 0,2 ml de la muestra por cada vial.
- Idealmente el número de viales a sembrar será de 2 por muestra. En algunos casos, según las características clínicas y a juicio del facultativo responsable del laboratorio, se podría incrementar el número de viales.
- Centrifugar a $2.500 \times g$ durante 30 minutos a 22°C.
- Aspirar la muestra, con cuidado de no levantar la monocapa.
- Añadir 1,5 ml de medio de cultivo e incubar a 33-35°C en estufa.
- Al día siguiente, visualizar los tubos al microscopio invertido para ver si la monocapa está en buenas condiciones y no existe contaminación; cambiar nuevamente el medio de crecimiento.
- Incubar a 33-35 °C en estufa, durante 4-6 días.

7.3. SUBCULTIVO O PASE DE LOS CULTIVOS

- Raspar la monocapa utilizando una punta de micropipeta o bien bolitas de vidrio estériles.
- Pasar 1ml del cultivo a un frasco Falcon de 25 cm^2 , en el que previamente se ha crecido una monocapa confluyente de células Vero y se ha retirado el medio de cultivo.
- Rotular el nuevo frasco poniendo el número de muestra, el número de pase y la fecha de subcultivo.
- Incubar 30 min. a temperatura ambiente, moviendo el frasco suavemente cada 5 min.
- Retirar el sobrenadante.
- Añadir 5 ml de medio de cultivo.
- Incubar a 33-35°C en estufa.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Aislamiento de <i>Rickettsia</i> spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo	PNT-EMG-07	
		Edición 01	Página 4 de 4

- Al día siguiente, observar los frascos al microscopio invertido, para ver si la monocapa está en buenas condiciones y no hay contaminación.
- Incubar a 33-35 °C en estufa.

7.4. PROCESAMIENTO DE LOS CULTIVOS.

Una vez incubado el cultivo durante 5-7 días, se raspa la monocapa y se procede a determinar si está creciendo una rickettsia mediante la tinción de Giménez, IFI con suero específico o técnicas moleculares, como la PCR. Para la identificación de la especie de rickettsia, se precisa la secuenciación de una diana específica de ADN. Aún obteniendo un resultado negativo, no se puede descartar la presencia de una rickettsia en el cultivo hasta pasados 20 días de incubación.

7.5. PUNTOS CRÍTICOS EN LA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

No existen puntos especialmente críticos fuera de la realización metódica de toda técnica de laboratorio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cultivos celulares se realizan en ausencia de antibióticos, por lo que hay que ser muy cuidadosos para prevenir contaminaciones. También, se deben manipular con precaución los cubreobjetos, para que no se rompan o se dañe la monocapa.

7.6. CONTROL DE CALIDAD

- El habitual de control de los reactivos.
- Cada nuevo lote de suero debe analizarse para asegurar el crecimiento adecuado de las células Vero. El resultado se señalará en el registro de control de calidad de reactivos correspondiente.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Un efecto citopático no indica necesariamente la presencia de una rickettsia en el cultivo. En este caso, si la realización de pruebas complementarias indica la ausencia de la bacteria, el resultado se debe expresar como "Muestra tóxica: resultado no valorable". Si con la tinción de Giménez se observara una imagen microscópica típica de crecimiento bacteriano, hay que tener en cuenta que no hay diferenciación a nivel de especie y que también pueden crecer otros microorganismos intracelulares, por lo que se deben realizar otros análisis para el diagnóstico etiológico de la infección. Los resultados de PCR e IFI en el cultivo se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente son las siguientes:

- Personal del área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras, rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo, realización de la

técnica, lectura y registro de resultados, archivo de hojas de trabajo.

- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, adopción de medidas correctoras en el caso de que se hayan cometido errores, firma del informe de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La positividad del cultivo en *shell vial* indica la presencia de una determinada especie de rickettsia en la muestra y, por tanto, demuestra que el paciente sufre una infección activa. Para asociar la infección al cuadro clínico del paciente deben valorarse conjuntamente todos los datos clínicos y epidemiológicos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El cultivo de rickettsias resulta muy laborioso y se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3, por lo que su realización queda limitada a los laboratorios que cumplan de este tipo de requisitos. Además, debido a su baja sensibilidad, no se recomienda realizar este procedimiento en el caso de muestras procedentes de pacientes que hayan comenzado un tratamiento antibiótico. Todo ello hace que este procedimiento resulte poco viable en la rutina hospitalaria, por lo que debe realizarse sólo en casos seleccionados. Por otra parte, la implicación de un número creciente de especies de rickettsia en patología humana hace que no se disponga, en ocasiones, de la experiencia adecuada para la identificación de determinadas especies potencialmente patógenas. En estos casos, las muestras deberán ser remitidas a un centro de referencia.

Una limitación de la técnica es el aumento de la toxicidad de la muestra sobre la monocapa celular durante el proceso. Esto ocurre especialmente en muestras como la sangre (fracción leucocitaria) y muestras de tejidos, precisamente aquellas en las que mayor significado clínico tiene el cultivo de la bacteria.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY et al. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. J Clin Microbiol 2005; 10:4993-5002.
2. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev 2005; 18:719-56.
3. Quesada M, Sanfeliu I, Cardenosa N et al. Ten years' experience of isolation of *Rickettsia* spp. from blood samples using the shell-vial cell culture assay. Ann N Y Acad Sci 2006; 1078:578-581.
4. Vestris G, Rolain JM, Fournier PE et al. Seven years' experience of isolation of *Rickettsia* spp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay. Ann N Y Acad Sci 2003; 990:371-374.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-08
DIAGNÓSTICO DE LAS RICKETTSIOSIS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las rickettsiosis mediante inmunofluorescencia indirecta	PNT-EMG-08	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el diagnóstico serológico de las rickettsiosis mediante la utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Este procedimiento es aplicable a los laboratorios clínicos que reciben muestras de sueros procedentes de pacientes con sospecha de infección por *Rickettsia* spp.

2. FUNDAMENTO

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *Rickettsia* spp., generalmente de tipo IgG e IgM. Al igual que otras serologías, este método se puede utilizar para el diagnóstico de la infección, para el seguimiento de la respuesta inmune específica y para conocer la prevalencia de anticuerpos frente a este microorganismo. Para la realización de esta técnica los antígenos utilizados, que consisten en células infectadas por diferentes especies de *Rickettsia*, están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos, sobre los que se añaden diferentes diluciones del suero del paciente. En el caso de que existan anticuerpos frente al correspondiente antígeno, se formará un complejo antígeno-anticuerpo que será revelado mediante una anti-inmunoglobulina humana de origen animal, marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y visualizado con un microscopio de fluorescencia.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Laboratory Biosafety Manual (WHO, 2003).
- Manual de instrucciones de funcionamiento y mantenimiento de equipos del laboratorio (centrífuga, termociclador, estufa, etc.).
- Preparación de medios, reactivos y viales con cultivos celulares.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.
- Protocolo del laboratorio de verificación y calibración de equipos e instrumentos.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

La muestra a analizar mediante IFI de rickettsias es el suero. Éste se recoge según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología". PNT-RTP-01 (2003), y se envía en contenedores estériles de un solo uso y con cierre hermético. El suero debe enviarse refrigerado lo

antes posible. Si el envío no se va a realizar de manera inmediata, conviene congelarlo a -20°C hasta su envío, el cual deberá llevarse a cabo en hielo seco para prevenir su descongelación.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En términos generales, el procedimiento utilizado para el procesamiento de estas muestras es el habitual del laboratorio de microbiología. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente. Además de estos casos, no se aceptará suero hemolítico ni hiperlipémico. Las muestras inaceptables no deberán procesarse y el médico deberá ser informado inmediatamente. En estos casos, se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de las muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal que lleva a cabo la manipulación como para la muestra.

Puesto que resulta importante realizar estudios cuantitativos de sueros del mismo paciente a lo largo del tiempo, es fundamental conservar una alícuota congelada a -20°C de cada muestra que se analice para poder realizar en paralelo el estudio comparativo con las diferentes muestras.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 (varios proveedores).
- Tween 80 (varios proveedores).
- PBS-Tween 80: diluir 65 ± 5 μL de Tween 80 en 1 L de PBS.
- Portaobjetos comerciales con el antígeno fijado (BioMérieux, Francia; Focus Diagnostics, USA; y Vircell, España).
- Anti-inmunoglobulina humana conjugada con FITC de procedencia comercial (varios proveedores).
- Cubreobjetos (60 $\times$ 24 mm) (varios proveedores).
- Líquido de montaje (varios proveedores).
- Azul de Evans (varios proveedores).

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las rickettsiosis mediante inmunofluorescencia indirecta	PNT-EMG-08	
		Edición 01	Página 3 de 4

6. APARATOS, MATERIAL E INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

6.1. INSTRUMENTAL

- Estufa.
- Microscopio de fluorescencia.

6.2. MATERIALES

- Tubos de plástico de fondo cónico tipo Eppendorf de 1,5 ml.
- Gradillas.
- Micropipetas de varios volúmenes.
- Puntas para micropipetas.
- Pipetas de 5 y 10 ml estériles.
- Pipetus.
- Vortex.
- Matraz aforado de 500 ml ó 1.000 ml para la preparación de soluciones.
- Frasco lavador para el tampón.
- Cubreobjetos de 60x24 mm.
- Cámara húmeda.
- Cubetas de lavado de los portaobjetos.
- Sujeta-portaobjetos.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

- 1) Antes de comenzar con la realización de la técnica, atemperar los portaobjetos, controles y conjugados durante 5 min.
- 2) Utilizando placas de microtitulación, realizar diluciones seriadas de los sueros (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 y 1/5120) con tampón PBS.
- 3) Sacar los portas con el antígeno teniendo cuidado de no tocar las áreas con antígeno. Para el marcado de los portas usar sólo lápiz de punta dura, nunca rotulador.
- 4) Aplicar 10 µl de cada dilución en cada pocillo por duplicado. Incluir un suero control positivo y un control negativo. El positivo consistirá en un suero de título alto, procedente de un paciente que ha sufrido una rickettsiosis. El negativo será un suero procedente de una persona que no ha sufrido esta infección.
- 5) Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
- 6) Extraer el portaobjetos de la cámara húmeda y lavar 2 veces durante 5 min. en una cubeta con PBS-Tween 80. No mover el portaobjetos dentro del PBS-Tween 80. Sacar los portas y enjuagarlos en otra cubeta con agua destilada. Dejar secar los portas completamente.
- 7) Añadir 10 µL del conjugado a la dilución recomendada a cada pocillo, cubriéndolos completamente con el mismo. La dilución del conjugado se prepara con una solución de azul de Evans al 1/100 en PBS. Se utilizan los conjugados anti-IgG, anti-IgM y anti-inmunoglobulinas totales.
- 8) Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.

9) Repetir el punto nº 6 y dejar secar.

10) Aplicar líquido de montaje y cubrir con el cubreobjetos sin que se formen burbujas. Eliminar el líquido de montaje sobrante.

7.2. LECTURA E INTERPRETACIÓN

Realizar una observación inmediata en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 20x. Si esto no fuera posible, guardar los portas en un lugar oscuro y frío para protegerlos de la desecación realizando la lectura dentro de las siguientes 24 h.

- En caso de resultado positivo se observa una fluorescencia puntiforme característica que evidencia la presencia de las rickettsias y contrasta con el rojo del citoplasma celular producido por el azul de Evans.

- Los sueros negativos dan lugar a una coloración roja uniforme.

Durante la observación, se recomienda no concentrarse mucho tiempo en la misma área, siendo preferible desplazarse por toda la preparación con el fin de evitar pérdidas de fluorescencia. Para ello debe hacerse un barrido con objetivo 20x.

7.3. PUNTOS CRÍTICOS EN LA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

No existen puntos especialmente críticos fuera de la realización metódica de toda técnica de laboratorio.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

- El habitual de control de los reactivos.
- Cada nuevo lote de suero control positivo debe titularse. El resultado se señalará en el registro de control de calidad de reactivos correspondiente.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la aceptación de los resultados, es imprescindible la validación del ensayo en función del resultado de los controles y los criterios establecidos por el fabricante. El control positivo debe presentar una fluorescencia intensa y brillante de color verde manzana y debe proporcionar el título esperado dentro del rango de una dilución mayor o menor. Si el título no es el esperado, se debe repetir todo el procedimiento. El control negativo debe presentar ausencia de fluorescencia. Una fluorescencia amarillenta o verde oscura corresponde a una reactividad inespecífica y no debe tenerse en cuenta.

Evaluación positiva: la fluorescencia específica es de un color verde manzana con una intensidad generalmente de 1+ (débil), 2+ (moderado), 3+ (brillante), hasta 4+ (muy brillante).

Evaluación negativa: ausencia de fluorescencia.

Como en todas las serologías, se considera que ha tenido lugar una seroconversión cuando al analizar dos muestras de suero obtenidas de un paciente con una diferencia de unos 20 días, se

Servicio de Microbiología Hospital	Diagnóstico de las rickettsiosis mediante inmunofluorescencia indirecta	PNT-EMG-08	
		Edición 01	Página 4 de 4

observa un aumento del nivel de anticuerpos de como mínimo cuatro veces el título inicial.

8.2 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos son cualitativos (positivo o negativo) y cuantitativos (título del suero).

- A partir de un título único mayor o igual a 1/40 el suero se considera positivo.
- Seroconversión: se observa un aumento del título de, al menos, cuatro veces entre los dos sueros pareados.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente serán las siguientes:

- Área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo, realización de la técnica, lectura de las preparaciones, registro de resultados y archivo de hojas de trabajo.
- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, interconsultas, adopción de medidas correctoras de errores cometidos y firma de informes de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Para minimizar la variabilidad entre diferentes ensayos, a la hora de estudiar la variación en el título de anticuerpos en un paciente a lo largo del tiempo, deben analizarse simultáneamente todos los sueros del paciente. Así, se evitan posibles variaciones de una o dos diluciones, disminuye el error debido al azar y se aumenta la exactitud de la técnica.

Cada suero se debe analizar utilizando los conjugados anti-IgM, anti-IgG o anti-inmunoglobulinas totales. En el caso de la determinación de las IgMs, previamente la muestra deberá tratarse con un reactivo comercial para la absorción de las IgGs, a efectos de eliminar falsos positivos debidos al factor reumatoide.

Hay que tener en cuenta que sólo existen portaobjetos comerciales para *R. conorii*, *R. rickettsii* y *R. typhi*. Para el estudio serológico con otras especies, se deben producir los antígenos y preparar los portas en el propio laboratorio. Esto presenta el inconveniente de que el cultivo de rickettsias resulta muy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3, por lo que su realización queda limitada a los laboratorios que cumplan estos requisitos.

Para una correcta interpretación de los resultados de serología, deben tenerse en cuenta los datos de reactividad basal de la población en zonas endémicas.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La IFI para la detección de anticuerpos frente a *Rickettsia* está considerada la mejor prueba diagnóstica serológica. Sin embargo, se encuentra limitada por las reacciones cruzadas entre diferentes especies de rickettsia. Otra limitación común a otros ensayos serológicos, es la necesidad del estudio de sueros pareados para poder demostrar una seroconversión, ya que en ocasiones no se llega a disponer de una segunda muestra de suero. Un inconveniente adicional es que la seroconversión puede tardar varias semanas en producirse desde el inicio de los síntomas, retrasando en el diagnóstico. Además, en algunos casos no se produce seroconversión, lo que no excluye la enfermedad.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect 2004; 10:1108–1132.
2. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis 2001; 32:897–928. (Erratum, Clin Infect Dis 33:749.).
3. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev 2005; 18:719-756.
4. Rolain JM, Shpynov S, Raoult D. Spotted-fever-group rickettsioses in north Asia. Lancet 2003; 362:1939.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-09
DETECCIÓN DIRECTA DE *Rickettsia* spp. EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *gltA*

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Rickettsia</i> spp. en muestras clínicas mediante amplificación genómica y secuenciación del gen <i>gltA</i>	PNT-EMG-09	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este procedimiento es describir la metodología de detección de las especies de *Rickettsia* en muestras clínicas mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional y posterior secuenciación del producto amplificado. Este procedimiento es aplicable a todas las muestras clínicas con sospecha de rickettsiosis que se reciben en los laboratorios de microbiología clínica que realicen diagnóstico molecular. También es aplicable al ADN extraído a partir de cultivos infectados con muestras clínicas (ver el PNT-EMG-07: Aislamiento de *Rickettsia* spp. a partir de muestras clínicas mediante cultivo).

2. FUNDAMENTO

Las técnicas moleculares son un instrumento valioso para el diagnóstico etiológico de las rickettsiosis, ya que pueden detectar en poco tiempo el genoma de cualquier patógeno potencial, independientemente de la viabilidad del microorganismo. Estas técnicas se ven menos afectadas que los cultivos por los tratamientos antibióticos previos, aunque también pueden disminuir la sensibilidad, y la obtención de los resultados es mucho más rápida en comparación con el cultivo. Además tienen alta sensibilidad y especificidad. Por el momento, la mayor parte de las técnicas descritas son de desarrollo propio (*in house*), no estando comercializadas. Aunque existe una gran cantidad de dianas descritas, el gen *gltA* es una de las más comúnmente utilizadas puesto que está presente en todas las especies de *Rickettsia*.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Laboratory Biosafety Manual (WHO, 2003).
- Manual de instrucciones de funcionamiento y mantenimiento de equipos del laboratorio (centrífuga, termociclador, estufa, etc.).
- Preparación de medios, reactivos y viales con cultivos celulares.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento del laboratorio sobre gestión de residuos.
- Protocolo del laboratorio de verificación y calibración de equipos e instrumentos.

4. MUESTRAS

4.1. TIPO DE MUESTRA, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras más adecuadas para el diagnóstico molecular de rickettsias son sangre extraída con citrato o EDTA, muestra cutánea de la escara de inoculación, contenido de pápulas o máculas y en el

caso de afectación neurológica, LCR. Se recogerá según se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología". PNT-RTP-01. 2003. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles de un solo uso y con cierre hermético.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

En términos generales, el procedimiento utilizado para el procesamiento de estas muestras es el habitual del laboratorio de microbiología, si bien hay que tener en cuenta que la bacteriemia durante una rickettsiosis es menor que en el caso de otras infecciones. Esto obliga a recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo.

Las muestras deben manejarse como si tuvieran microorganismos potencialmente peligrosos. Cuando una muestra se recibe en el laboratorio, y antes de procesarse, debe someterse a una inspección previa para asegurarse que ha sido bien seleccionada, recogida y transportada. Las muestras se rechazarán en los siguientes casos: 1) muestra no identificada, 2) transporte inadecuado o demasiado prolongado, 3) muestra derramada, 4) cantidad insuficiente. Las muestras inaceptables no deben procesarse y el médico debe ser informado inmediatamente. En estos casos, se contactará con el médico solicitante para pedir una nueva muestra.

Los consejos generales para optimizar el procesamiento de muestras son:

1. Comprobar que el etiquetado de la muestra es correcto.
2. Registrar toda la información necesaria que pudiera afectar a la calidad de la muestra y que represente interés diagnóstico así como aspectos relacionados con su recogida, transporte y conservación.
3. Durante el procesamiento, deben seguirse todas las medidas de seguridad necesarias, tanto para el personal como para la muestra.
4. El procesamiento debe llevarse a cabo tan pronto como sea posible garantizando de esta forma la estabilidad del ADN del patógeno.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizará el *kit* "QIAamp DNA Blood" (QIAGEN, Hilden, Germany), para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre, suero y LCR. Para biopsias cutáneas se utilizará el *kit* "QIAamp DNA Tissue" (QIAGEN).

5.2. REACTIVOS PARA LA AMPLIFICACIÓN (volumen de reacción: 100 µL).

- 1× de tampón de PCR.
- 0, 2 µM de MgCl₂.
- Dinucleótidos trifosfato (dNTPs) a 200 µM cada uno de ellos (varios proveedores).

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Rickettsia</i> spp. en muestras clínicas mediante amplificación genómica y secuenciación del gen <i>gltA</i>	PNT-EMG-09	
		Edición 01	Página 3 de 4

- Oligonucleótidos 10 pmol μ mol de cada uno de ellos:
Rp877p: 5'-GGGGACCTGCTCACGGCGG-3'
Rp1258n: 5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'
- 1,25 U *Taq* polimerasa (varios proveedores).

5.3. REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS

- Tampón TBE 1 $\times$ (Tris-HCl 100 mM, ácido bórico 90 mM, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH 8,3).
- Tampón de carga para electroforesis (azul de bromofenol 0,25%, cianol xileno FF 0,25%, glicerol 30%).
- Marcador de tamaño molecular de intervalo 100-1.000 pb (varios proveedores).
- Agarosa "Low Melting" (varios proveedores).
- Bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Agua destilada.

5.4. REACTIVOS PARA LA PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Se utilizará el *kit* "QIAquick gel extraction" (QIAGEN).

5.5. REACTIVOS PARA LA SECUENCIACIÓN

Se utilizará el *kit* "BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction" Applied Biosystems (USA).

6. APARATOS Y MATERIAL NECESARIOS

6.1. INSTRUMENTAL

- Cabina de Seguridad Biológica de clase IIA.
- Microcentrífuga para tubos de fondo tipo Eppendorf y rotor angular, con velocidad de rotación de 16.000 $\times g$.
- Agitador orbital tipo vortex.
- Bloques de calor seco o termobloques.
- Termociclador.
- Balanza de precisión.
- Espectrofotómetro.
- Microondas para fundir la agarosa.
- Cubetas de electroforesis.
- Fuente de alimentación para electroforesis convencional.
- Transiluminador de UV.
- Equipo fotográfico o de captación de imágenes.
- Nevera (2-8°C).
- Congelador (-20°C).

6.2. MATERIALES

- Tubos tipo Eppendorf de 1,5 y 0,2 ml.
- Gradillas de diferentes formatos.
- Gradillas congeladora (-20°C) y refrigeradora (2-8°C).
- Cajas de congelación para tubos Eppendorf.
- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Puntas de micropipeta estériles provistas de filtro a prueba de aerosoles.
- Tubo Vacutainer estéril o tubo con tapón de rosca para recogida de LCR.

- Hisopo (torunda) y un tubo Eppendorf con 500 μ L de suero salino estéril para resuspender la muestra (raspado o líquido vesicular).
- Tubo Vacutainer con anticoagulante EDTA o citrato para extracción de la sangre.
- Botellas esterilizadas mediante calor seco para preparar tampones y geles de agarosa.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras se utilizará el "kit QIAamp DNA Blood" para sangre, suero y LCR. Para biopsias cutáneas se utilizará el *kit* "QIAamp DNA Tissue". En ambos casos se seguirán las instrucciones del fabricante.

7.2. AMPLIFICACIÓN.

7.2.1. Controles necesarios.

- Control positivo: ADN de *Rickettsia* a una dilución límite de detección para comprobar la eficacia de la amplificación de la PCR.
- Control negativo de extracción: extraer una muestra de agua en las mismas condiciones y a la vez que se extraen las muestras para analizar. Este control permite comprobar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de extracción.
- Control negativo de PCR: se amplifica una muestra del agua estéril. Este control permite comprobar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de amplificación.

- Para confirmar que el ADN se ha extraído correctamente y que no existen inhibidores en la muestra que impidan el proceso de amplificación, debe amplificarse en cada una de las muestras un control interno, por ejemplo el de la betaglobina que amplifica un fragmento de 150 pb (iniciadores: sense-CATGCCTCTTTGCACCATTC y antisense-TGGTAGCTGGATTGTAGCTG).

7.2.2. Condiciones de la PCR.

- Un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 min.
- 40 ciclos de los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización a 95°C durante 30 s.
 2. Hibridación a 45°C durante 30 s.
 3. Extensión a 65°C durante 55 s.
- Un ciclo para completar la extensión de los productos de PCR. Consiste en una incubación a 72°C durante 3 min.

7.3. ELECTROFORESIS.

- Preparar del gel de agarosa al 1% en de tampón TBE 1 $\times$.
- Cargar el gel, añadiendo previamente el tampón de carga a las muestras. Utilizar uno de los pocillos para cargar el marcador de tamaño molecular.
- Conectar la fuente de electroforesis de manera que no se sobrepasen 5 V/cm (considerando la distancia más corta entre los electrodos). Lo habitual es que se conecte a 100-150 V.
- Desconectar la fuente cuando el colorante azul de bromofenol esté aproximadamente a la mitad del gel

Servicio de Microbiología Hospital	Detección directa de <i>Rickettsia</i> spp. en muestras clínicas mediante amplificación genómica y secuenciación del gen <i>gltA</i>	PNT-EMG-09	
		Edición 01	Página 4 de 4

(aproximadamente 1 hora). Para visualizar los amplicones depositar el gel sobre un transiluminador con luz ultravioleta en un lugar oscuro.

7.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN

Para validar los resultados del ensayo, en la carrera del control negativo no debe aparecer ninguna banda y en la del control positivo debe aparecer una banda de 380 pb. Para poder interpretar si ha habido amplificación en las muestras, debe aparecer en cada una de ellas la banda correspondiente al amplificado de control interno.

7.5. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO Y SECUENCIACIÓN

El producto amplificado se purifica cortando la banda a partir del gel de agarosa y utilizando el *kit* "QUIAquick gel extraction kit", siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se somete a una nueva amplificación con concentraciones limitantes de dideoxinucleótidos marcados (secuenciación unidireccional). Se utiliza el *kit* "BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction" con los mismos oligonucleótidos que los usados en la fase de amplificación, a razón de 3 pmol por reacción de secuencia. Mediante el empleo de un secuenciador automático los amplificados se resuelven mediante electroforesis capilar, obteniéndose un cromatograma con la secuencia de bases.

Finalmente, la secuencia de ácidos nucleicos se edita y se compara, mediante el empleo de un software específico, programas de alineamiento utilizando secuencias de referencia o bien mediante comparación *on line* con secuencias de bases de datos (Blastn).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de PCR se expresan en términos cualitativos de positivo o negativo. Los datos de secuencia permiten identificar la especie implicada.

Cuando se notifica un resultado de PCR negativo se debe tener en cuenta que, en ocasiones, la carga bacteriana en algunas muestras suele ser muy baja y por tanto los métodos moleculares pueden no ser suficientemente sensibles, por lo que un resultado negativo no descarta una infección.

9. RESPONSABILIDADES

Básicamente son las siguientes:

- Personal del área de recogida y procesamiento de muestras: recepción, identificación y procesamiento de las muestras, rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas y adopción de medidas correctoras.
- Personal técnico: control de las muestras, solicitudes y hojas de trabajo, realización de la técnica, lectura y registro de resultados, archivo de hojas de trabajo.

- Facultativo responsable: supervisión del trabajo y de los resultados, resolución de dudas técnicas, adopción de medidas correctoras en el caso de que se hayan cometido errores, firma del informe de resultados.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En el caso de la amplificación del gen *gltA* que se describe en este procedimiento, la elevada conservación de las secuencias de ADN en las regiones donde se han diseñado los oligonucleótidos permite que se trate de una PCR genérica. Además, la secuenciación del producto amplificado permite diferenciar a nivel de especie. Otros genes comúnmente analizados tienen el inconveniente de que no están presentes en todas las especies. Es el caso de dos genes que codifican sendas proteínas de la membrana externa: *rOmpA* (presente en todas las especies del grupo de las fiebres manchadas (GFM) excepto *R. helvetica*, *R. australis*, *R. bellii* y *R. canadensis*) y *rOmp B* (presente en todas las especies excepto *R. helvetica*, *R. bellii* y *R. massiliae*). También se utilizan el gen que codifica la proteína de 17-kDa (válido para todas las rickettsias del GFM) y el gen D (válido para la mayoría de las especies).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Si bien la PCR es una prueba ideal para el diagnóstico de estas infecciones, existen algunas desventajas en comparación con el cultivo, como son la limitación para realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos y la imposibilidad de coleccionar los aislados para futuras investigaciones. Se deben establecer algunos parámetros antes de incorporar estas pruebas a los protocolos de diagnóstico clínico de los hospitales, como por ejemplo definir el control interno de inhibición, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de la técnica.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Ge H, Tong M, Jiang J et al. Genotypic comparison of five isolates of *Rickettsia prowazekii* by multilocus sequence typing. FEMS Microbiol Lett 2007; 271:112-117.
2. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of *rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol 1991; 173:1576-1589.
3. Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M et al. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int J Syst Bacteriol 1997; 2:252-261.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-EMG-10
DETECCIÓN DE ADN DE *Tropheryma whipplei* EN MUESTRAS CLÍNICAS MEDIANTE PCR

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología Clínica del Hospital..... La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital	Detección de ADN de <i>Tropheryma whipplei</i> en muestras clínicas mediante PCR	PNT-EMG-10	
		Edición 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir la metodología que se sigue para la detección cualitativa de ADN de *Tropheryma whipplei* en distintas muestras clínicas (biopsia duodenal, adenopatías, LCR, etc.) mediante PCR. Se describe el procedimiento a seguir para la realización de dos técnicas de PCR en formato convencional con iniciadores específicos del gen 16S ARNr y *hsp65* de *T. whipplei*.

2. FUNDAMENTO

La enfermedad de Whipple es una infección multisistémica rara, causada por la bacteria recientemente descrita *Tropheryma whipplei*. La amplificación por PCR con iniciadores específicos permite detectar distintas regiones del ADN de *T. whipplei* directamente en muestras de biopsias, adenopatías y líquidos estériles. Estas técnicas son por el momento, la únicas disponibles para el diagnóstico de la enfermedad en los laboratorios de microbiología clínica, ya que el cultivo del microorganismo es muy complejo y no hay métodos serológicos fácilmente disponibles.

El procedimiento consta de varias fases: preparación de la mezcla de reacción de PCR, extracción del ADN total de la muestra clínica, realización de la PCR en termociclador, detección de los productos amplificados en geles de agarosa, purificación y secuenciación de los mismos, alineamiento de secuencias en *Genebank* e interpretación de resultados.

Para evitar falsos positivos se deben analizar dos regiones distintas del ADN de *T. whipplei* y secuenciar todos los productos obtenidos para asegurar su identidad. En este caso, se analizan una parte del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S de *T. whipplei* (este gen se encuentra en varias copias dentro del genoma) y un fragmento del gen que codifica para la proteína de choque térmico 65 de *T. whipplei*. Esta última se detecta mediante una PCR "semianidada". Además se detectará el gen de la β -globina humana, como control positivo de una correcta extracción de ADN de las muestras procesadas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de instrucciones del kit de extracción: QuiAmp DNA Minikit (Quiagen®).
- Manual de instrucciones del kit de purificación de productos de PCR: High Pure PCR product purification Kit (Roche®).
- Manual de instrucciones de los termocicladores, microcentrifugas, fuentes y cubetas de electroforesis).
- Normas de gestión de residuos.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Registro de calibraciones de los termocicladores.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe estar estrictamente cumplimentado y en el deberá constar la filiación, edad, número de historia, servicio de procedencia, tipo de muestra (de forma muy específica), tratamiento previo y diagnóstico del enfermo, así como el código del clínico que realiza la petición.

Si se envían muestras desde otros hospitales, es conveniente que estos establezcan previamente contacto telefónico con el facultativo responsable de la realización de la técnica.

4.2. TIPOS DE MUESTRAS

Se admiten las siguientes muestras: Biopsia duodenal (es recomendable obtener varias muestras de las porciones proximal y distal de yeyuno e íleon), biopsias o aspirados de adenopatías, biopsias cerebrales, válvulas cardíacas, humor vítreo y acuoso, líquidos articular, cefalorraquídeo y pleural. En caso de que no se pueda recoger otra muestra, se podrá enviar sangre periférica (pero el rendimiento es mucho menor que con otras muestras).

Se podrán admitir muestras incluidas en parafina o tratadas con formol, pero se resaltarán en la interpretación de resultados su menor rentabilidad diagnóstica. No son admisibles muestras de saliva, orina o heces.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El rendimiento de las técnicas a realizar depende, en gran medida, de una correcta manipulación y conservación de las muestras. Las muestras se deben recoger asépticamente y a ser posible antes del inicio del tratamiento antibiótico. Se deben introducir en contenedores estériles de tamaño adecuado y deben enviarse rápidamente al laboratorio de microbiología clínica, sin añadir conservantes ni aditivos, aunque se pueden introducir en suero salino estéril, para evitar su desecación si el envío se va a demorar.

Es conveniente procesar las muestras de forma rápida. Se deben conservar a 4°C hasta su análisis y durante un máximo de unos 3 días. Si no es posible realizar la extracción de ADN con rapidez o se van a enviar las muestras a un laboratorio externo, se deben conservar congeladas a -20°C o -70°C hasta su análisis. Las muestras no se deben someter a ciclos de congelación y descongelación (una vez congeladas sólo se deben descongelar para realizar la extracción del ADN). En todos los pasos de obtención y

Servicio de Microbiología Hospital	Detección de ADN de <i>Tropheryma whippelii</i> en muestras clínicas mediante PCR	PNT-EMG-10	
		Edición 01	Página 3 de 7

manipulación de las muestras, se deben seguir normas de bioseguridad adecuadas.

El líquido articular y la sangre periférica se deben enviar en tubos con anticoagulante EDTA. Si se emplea sangre periférica, se debe analizar en su totalidad y no solamente el suero. Es preferible no emplear tubos con heparina, ya que inhibe la *Taq* ADN polimerasa.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Deben ser cuidadosamente observadas las siguientes incidencias relacionadas con la muestra:

- 1ª Muestras mal identificadas.
- 2ª Mala conservación (temperatura inapropiada, muestras en medio no apropiado).
- 3ª Muestras deterioradas (biopsias secas, muestras derramadas, etc.).
- 4ª Muestra insuficiente para las determinaciones solicitadas.

Todas estas incidencias deben comunicarse al servicio peticionario, indicando si se realizará el procesamiento o no de la muestra y notificando las incidencias en el volante de resultados y las precauciones necesarias a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se puede emplear cualquier método convencional de extracción y purificación de ADN, por ejemplo el método de fenol-cloroformo ya descrito en otros procedimientos (ejemplo PNT-VIR-07).

Por su sencillez, recomendamos los métodos comerciales, basados en la extracción con columnas tipo QIAmp DNA Minikit (Quiagen®).

En caso de muestras incluidas en parafina, éstas se lavarán con xileno y etanol absoluto, antes de la etapa de extracción con columnas.

5.2 REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

- Gen 16 S ARNr

“Master mix”

Volumen/reacción

W3FE (5µM)*5 µl
W2RB (5 µM).....5 µl
dNTP's (25mM).....0,4 µl
buffer 10x**.....5 µl
MgCl₂ (25mM).....4 µl
H₂O libre de nucleasas.....24,6 µl
Taq ADN pol (1U/ µl).....1 µl

45 µl

- Región *hsp65*

“Master mix 1”

Volumen/reacción

whipp-frw1 (5µM)*5 µl
whipp-rev(5 µM)5 µl
dNTP's (25mM)0,4 µl
buffer 10x**5 µl
MgCl₂ (25mM)4 µl
H₂O libre de nucleasas.....24,6 µl
Taq ADN pol (1U/ µl).....1 µl

45 µl

“Master mix 2”

Volumen/reacción

whipp-frw2 (5µM)*5 µl
whipp-rev(5 µM)5 µl
dNTP's (25mM)0,4 µl
buffer 10x**5 µl
MgCl₂ (25mM)4 µl
H₂O libre de nucleasas.....28,6 µl
Taq ADN pol (1U/ µl)1 µl

49 µl

- β-globina humana

“Master mix”

Volumen/reacción

β-globF (5µM)*5 µl
β-globR (5 µM)5 µl
dNTP's (25mM)0,4 µl
buffer 10x**5 µl
MgCl₂ (25mM).....5 µl
H₂O libre de nucleasas.....23,6 µl
Taq ADN pol (1U/ µl).....1 µl

45 µl

Notas:

Los iniciadores se preparan en solución stock de 100 µM a partir del liofilizado y se conservan a -20°C.

*Entre paréntesis figuran las concentraciones de la solución de trabajo de cada reactivo.

** Se empleará el tampón adecuado para la Taq ADN polimerasa que se utilice.

Todos los reactivos se conservarán en alícuotas a -20°C. A la hora de preparar las distintas “master mixes” se debe considerar, que hay que emplear tantos tubos como muestras se procesen, una dilución 1/10 de cada una de las muestras, un control negativo cada 5 muestras, un control negativo de extracción y un control positivo.

Iniciadores de PCR :

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Región amplificada	Tamaño amplicón (pb)
W3FE W2RB	f : GGA ATT CCA GAG ATA CGC CCC CCG CAA r : CGG GAT CCC ATT CGC TCC ACC TTG CGA	gen 16S rARN	284
whipp-frw1 whipp-rev	f : TGA CGG GAC CAC AAC ATC TG r : ACA TCT TCA GCA ATG ATA AGA AGT T	<i>hsp65</i> 1ª amplificación	500
whipp-frw2 whipp-rev	f : CGC GAA AGA GGT TGA GAC TG r : ACA TCT TCA GCA ATG ATA AGA AGT T	<i>hsp65</i> 2ª amplificación	357
βglobF βglobR	f: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC r:GGA AAA TAG ACC AAT AGG CAG	β-globina humana	400

5.3. DETECCIÓN DE AMPLICONES

- Agarosa: Preparar un gel de agarosa al 1,4% en tampón TBE 1x, de tamaño adecuado a la cubeta de electroforesis que se utilice.

- TBE 1X: 100ml de TBE 10X comercial+ 900 ml del agua destilada.

- Bromuro de etidio: solución stock de 10mg/ml. Conservar a 4°C protegido de la luz. Se añaden 5 µl a cada 100 ml de suspensión de agarosa. Manipular siempre con guantes, es un reactivo tóxico.

- Buffer de carga:
Azul de bromofenol al 1%2,5 ml
Ficoll2,5 g
EDTA 0,5M pH 81 ml
Agua destilada10 ml

- Marcadores de peso molecular (100pb)
- Agua destilada
- Tampón PBS comercial

5.4. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES

Para la purificación de amplicones previa a la secuenciación, se recomienda el empleo de kit comerciales tipo: High Pure PCR product purification Kit (Roche®).

5.5. SECUENCIACIÓN

Kit de secuenciación de ácidos nucleicos, basado en el método de los dideoxinucleótidos marcados, adaptado al secuenciador disponible.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas (diferentes en cada área de trabajo).
- Puntas de micropipeta de "calidad molecular" con filtro.
- Gradillas para tubos sarstedt o similares.

- Agitador tipo vortex.
- Tubos de reacción de 1,5 ml de "calidad molecular" (tipo sarstedt).
- Rejillas, Bases, tubos y tapas de PCR adaptados al termociclador.
- Bandeja con hielo.
- Cabina de seguridad biológica.
- Hojas de bisturí estériles.
- Placas de Petri estériles.
- Termobloques.
- Microcentrífuga.
- Termociclador.
- Balanza.
- Matraces y probetas para preparar la suspensión de agarosa.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Horno microondas o baño de agua caliente.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.
- Secuenciador automático de ácidos nucleicos.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

7.1.1. Distribución de áreas de trabajo

Área 1 (Se realizará en primer lugar para no tener que volver a este área)

- Preparación de alícuotas de los reactivos del Kit de extracción en tubos sarstedt.
- Preparación de "master mixes".
- Distribución de "master mix" 16S ARNr, β-globina y "master mixes" 1 y 2 de la región *hsp65* en los tubos y placas de PCR.

Área 2

- Preparación de las muestras, extracción y purificación de ácidos nucleicos.
- Incorporación del ADN extraído a las los tubos que contienen cada "master mix".

Servicio de Microbiología Hospital	Detección de ADN de <i>Tropheryma whipplei</i> en muestras clínicas mediante PCR	PNT-EMG-10	
		Edición 01	Página 5 de 7

Área 3

- Reacciones de amplificación
- Detección de amplicones
- Purificación de amplicones
- Reacciones de secuenciación

7.1.2. Preparación de reactivos

Área 1

- Preparación de alícuotas de los reactivos del *kit* de extracción en tubos *sarstedt*.
- Preparación de “master mixes” (gen 16S ARNr, β -globina, “master mix” 1 y 2 de hsp65). Para realizar los cálculos conviene tener en cuenta el número de controles positivos y negativos que se van a utilizar.
- Distribución de “master mixes” en los tubos y placas de PCR (se añadirán 45 μ l de cada una de las 3 “master mixes” 16S ARNr, β -globina y “master mix” 1 de hsp65, a tubos de PCR de placas separadas y 49 μ l a los tubos de la placa de PCR que contiene la “master mix” 2 de hsp65). Los tubos con la “master mix” 1 de hsp65 y la de β -globina se pueden colocar en la misma placa de PCR, ya que comparten secuencia térmica de amplificación.

La preparación de las “master mixes” se debe realizar en hielo y las placas de PCR se deben conservar refrigeradas hasta su utilización (no más de 4 horas). La placa que contiene la “master mix” 2 de la región hsp65 se puede conservar congelada hasta su utilización (no más de una semana).

7.1.3. Preparación de muestras

Las muestras se deben procesar en el área 2 y en campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad adecuado. Todas las muestras se deben atemperar antes de su procesamiento. Las muestras líquidas (sangre, LCR, líquido articular, etc.) se deben homogenizar completamente. Las muestras de tejido se fragmentarán y homogenizarán con un bisturí sobre una placa Petri estéril en condiciones asépticas. Una vez homogenizada, la muestra se introducirá en tubos *sarstedt* rotulados adecuadamente. Es conveniente conservar un fragmento de muestra por si son necesarios análisis posteriores.

En caso de muestras incluidas en parafina, éstas se lavarán con xileno y etanol absoluto, antes de la etapa de extracción con columnas:

- Dividir la muestra en fragmentos pequeños e introducir en tubo *sarstedt*.
- Añadir 1,5 ml de xileno y agitar en vortex a máxima velocidad 3 min..
- Centrifugar a 13.000 rpm 5 min.
- Retirar el sobrenadante y repetir una vez más.
- Añadir etanol absoluto al pellet y agitar en vortex 3 min.
- Centrifugar a 13.000 rpm 5 min.
- Retirar el sobrenadante de etanol y repetir una vez más.
- Dejar evaporar el etanol retenido por el pellet y lavar con PBS.
- Centrifugar a 13.000 rpm 5 min.

- Retirar el PBS y procesar como el resto de biopsias.

Las muestras recibidas en formol se lavarán 2 veces con tampón PBS antes de la extracción del ADN.

7.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Si se emplean métodos comerciales, se deben seguir las recomendaciones del fabricante para la extracción de ADN de tejidos, líquidos biológicos o sangre. Es conveniente prolongar la incubación con proteinasa K, hasta la lisis completa de la muestra (alrededor de 2,5 h). Los líquidos se centrifugarán (1 ml) en un tubo tipo *sarsted* de fondo cónico, a 13.000 rpm durante 10 min. Se analizarán pellet y sobrenadante por separado (la totalidad del pellet y 500 μ l de sobrenadante).

Se debe extraer al menos una muestra libre de ADN de *T. whipplei* como control negativo de extracción.

7.3. AMPLIFICACIÓN Y REAMPLIFICACIÓN DE ADN DE *T. whipplei* POR PCR

Controles: en cada placa de PCR se introducirá un control negativo (agua bidestilada estéril y libre de nucleasas) cada 5 muestras, un control positivo (muestra previamente positiva o plásmido construido a tal efecto) y controles negativos de extracción.

• Gen 16S ARNr

- Distribuir 45 μ l de “master mix” en cada tubo de la placa de amplificación (en área 1 y en hielo).
- Añadir 5 μ l del ADN extraído, una dilución 1/10, controles negativos y positivos a los distintos tubos de la placa de PCR que contienen la “master mix” (en área 2 y en hielo).
- Tapar los tubos e introducir la placa en el termociclador, con el siguiente programa de PCR:
 - Desnaturalización inicial, 94°C 5 min.
 - 40 ciclos de PCR: desnaturalización 94°C 1 min., anillamiento 60°C 1 min., elongación 72°C 1 min.
 - Elongación final: 72°C 10 min.
 - Refrigeración 4°C

• “Master mix” 1 de hsp65 y β -globina

- Distribuir 45 μ l de la “master mix” 1 de hsp65 en cada tubo de la placa de amplificación y en paralelo otros 45 μ l de la “master mix” de β -globina (en área 1 y en hielo).
- Añadir 5 μ l del ADN extraído, una dilución 1/10, controles negativos y positivos, en cada tubo de la placa de PCR que contiene 45 μ l de cada “master mix” (en área 2 y en hielo). En la PCR de β -globina no es necesario incluir una dilución 1/10 de cada muestra.
- Tapar los tubos e introducir la placa en el termociclador, con el siguiente programa de PCR.
 - Desnaturalización inicial: 94°C 5 min.
 - 40 ciclos de PCR: desnaturalización 94°C 1 min., anillamiento 57°C 1 min., elongación 72°C 1 min.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección de ADN de <i>Tropheryma whipplei</i> en muestras clínicas mediante PCR	PNT-EMG-10	
		Edición 01	Página 6 de 7

- Elongación final: 72°C 10 min.
- Refrigeración 4°C.

• “Master mix” 2 de hsp65

- Distribuir 49 µl de la “master mix” 2 de hsp65 en cada tubo de la placa.
- Congelar hasta que termine la primera amplificación.
- Añadir 1 µl del producto de amplificación de la “master mix” 1 hsp65. Incluir un nuevo control negativo y positivo en cada tubo de la placa de PCR (en área 3 y en hielo).
- Tapar los tubos e introducir la placa en el termociclador, con el siguiente programa de PCR:
 - Desnaturalización inicial: 94°C 5 min.
 - 30 ciclos de PCR: desnaturalización 94°C 1 min., anillamiento 60°C 1 min., elongación 72°C 1 min.
 - Elongación final: 72°C 10 min.
 - Refrigeración 4°C.

7.4. DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

- Preparar un gel de agarosa al 1,4 % en TBE 1x y con bromuro de etidio e introducirlo en una cubeta de electroforesis con TBE 1x.
- En tubo *sarstedt* añadir 2µl de buffer de carga a 10 µl de muestra (productos amplificados de las distintas PCR's).
- Cargar 10µl de cada una de las muestras en el gel, incluyendo el marcador de 100 pb.
- Correr el gel a 100V hasta que el frente alcance el borde del mismo.
- Visualizar el gel con transiluminador UV.

7.4.1. Lectura e interpretación de resultados

- En la calle del gel correspondiente a los controles negativos, no debe observarse ninguna banda de amplificación. Si aparece indica contaminación de la PCR y el ensayo no se debe considerar válido. Todos los controles positivos, deben presentar una banda de amplificación de tamaño adecuado (16S ARNr: 284 pb, hsp65-1: 500 pb, hsp65-2: 357 pb). En el control positivo de la 2º PCR de hsp65 se pueden detectar 2 bandas de amplificación de 500 pb y 357pb o una banda de 357pb. Todas las muestras deben presentar la banda de amplificación del gen de la β-globina (400 pb), en caso contrario las muestras estarán inhibidas y debe repetirse la PCR con una nueva extracción de ADN. Para que una muestra se considere positiva, debe presentar amplificación en las dos regiones del ADN de *T. whipplei* analizadas (16S ARNr y hsp65) y todos los controles deben ser positivos o negativos como corresponda.

7.5. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES

Una vez obtenida amplificación para una muestra determinada, se purificarán los amplicones correspondientes para, posteriormente, realizar las

reacciones de secuenciación. Se deben seguir las instrucciones del *kit* que se emplee.

7.6. SECUENCIACIÓN

Como existen numerosos métodos y aparatos de secuenciación de ácidos nucleicos se deben seguir las instrucciones del fabricante del sistema de secuenciación que se utilice. Escapa al objetivo de este PNT describir la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos.

7.7. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Para cada muestra, se debe confirmar la identidad de cada uno de los amplicones obtenidos en el análisis de las dos regiones del ADN de *T. whipplei*.

Se puede realizar en *Genebank* usando BLAST (*Basic-local-alignment-search-tool*) software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para ello se copia la secuencia obtenida en formato FASTA, en la sección dedicada a ello de la página de BLAST. Se selecciona la base de datos de nucleótidos y se envía a *Genebank*, que devuelve por vía electrónica el alineamiento de la secuencia enviada, con las secuencias similares que se encuentran en la base de datos. El sistema proporciona un porcentaje de similitud. La obtención de un alineamiento con un porcentaje de similitud ≥99%, con una secuencia de la misma región de *T. whipplei* que la que se ha analizado, se considera que confirma la identidad del amplicón obtenido.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Las muestras se informarán como positivas: si se detecta una banda de amplificación de 284 pb en la PCR del gen 16S ARNr y bandas de 500 pb y 357 pb en las PCRs hsp65 1 y 2, en la muestra sin diluir y/o diluida 1/10. El alineamiento de las secuencias de los amplicones obtenidos, debe tener una identidad ≥ 99% con una secuencia de la misma región de *T. whipplei* y la PCR del gen de la β-globina debe presentar una banda de 400 pb para cada muestra.

Las muestras se informarán como negativas: si no se obtienen bandas de amplificación en las PCRs del gen 16S ARNr ni hsp65 y se obtiene una banda de 400 pb. en la PCR de la β-globina.

Las muestras se considerarán inhibitorias: si no aparece banda de amplificación de 400 pb. en la PCR de la β-globina, aún después de una nueva extracción y repetición de la PCR. Si aparecen bandas de amplificación en los controles negativos el ensayo se considerará inválido (por posible contaminación del proceso) y se repetirá de nuevo. Si los controles positivos no presentan amplificación, se considerará que ha habido algún error de procesamiento y se repetirá el análisis.

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La

Servicio de Microbiología Hospital	Detección de ADN de <i>Tropheryma whippelii</i> en muestras clínicas mediante PCR	PNT-EMG-10	
		Edición 01	Página 7 de 7

información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de microbiología.

Área de recogida y procesamiento de muestras del laboratorio de microbiología: recepción, identificación y procesamiento de las muestras. Rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras.

Personal técnico: realización del procesamiento de las muestras y técnicas de PCR. Registro de resultados. Archivo de hojas de trabajo. Archivo de alícuotas de ADN o muestras.

Facultativo responsable: supervisión del trabajo, alineamiento de secuencias e interpretación de resultados. Resolución de dudas técnicas. Resolución de errores cometidos. Emisión y validación de informes de resultados. Interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de biología molecular. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.

Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de diagnóstico molecular en el que se realizan técnicas de PCR, se debe distribuir el trabajo en 3 áreas perfectamente diferenciadas:

- Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos. En la que no se introducirán muestras ni reactivos que contengan ADN, tanto amplificado como no amplificado. En este área se preparan las mezclas reacción ("master mix") de la PCR.
- Área 2 o de manipulación de muestras y extracción de ADN. En este área se procesan las muestras, se realiza la extracción y purificación del ADN y se añade el ADN a la "master mix". En esta zona no se debe introducir ADN amplificado.
- Área 3 o de amplificación. En este área se detectan y procesan los productos de PCR (carga de geles, purificación, etc.).

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser: área 1→2→3 y nunca a la inversa.

Es importante que para el manejo del material que esté en contacto con bromuro de etidio, se usen siempre guantes y se extremen las precauciones de seguridad, ya que es un reactivo muy tóxico. La visualización de geles con transiluminador UV, debe realizarse con caretas protectoras o en sistema cerrado de visualización de geles.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida. Las muestras de sangre periférica y las enviadas en parafina o tratadas con formol, en general tienen bajo rendimiento de amplificación.

Los resultados obtenidos en las PCRs dependen en gran medida de la realización de las técnicas en hielo.

Se desconoce la utilidad de estas técnicas en pacientes en tratamiento.

Se recomienda no rechazar muestras sin consultar previamente con el clínico responsable del paciente.

Ocasionalmente, se pueden producir inhibiciones de la PCR que no permitirán obtener un resultado y que se detectarán por falta de amplificación del gen β -globina humana. En estos casos se repetirá de nuevo el procedimiento desde el principio, volviendo a extraer el ADN de la muestra si es posible o en su caso analizando el mismo ADN y una dilución 1/10. Si aún así no se consigue obtener amplificación el resultado será de: muestra inhibitoria.

Excepcionalmente, se pueden obtener resultados discordantes entre las PCRs de las distintas regiones analizadas. Si una de las dos regiones analizadas aparece como positiva y la otra como negativa o si las secuencias no presentan identidad con *T. whippelii*, se repetirá el análisis con un nuevo fragmento de muestra. Si aún así, se obtienen resultados discordantes, se informará cada PCR como positiva o negativa según corresponda y se recomendará interpretar los resultados con precaución (para su interpretación se deberán considerar los datos clínicos del paciente, los resultados de la tinción de PAS de las muestras, los resultados de PCR de otras muestras del mismo paciente, etc.) y si está disponible se podrá analizar una tercera región del genoma de *T. whippelii*.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Fenollar F, Raoult D. Molecular techniques in Whipple's disease. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1:299-309.
2. Marín M, Muñoz P, Sanchez M, et al. *Tropheryma whippelii* infective endocarditis as the only manifestation of Whipple's disease. J Clin Microbiol 2007; 45:2078-2081.
3. Morgenegg S, Dutly F, Altwegg M. Cloning and sequencing of a part of the heat shock protein 65 gene (hsp65) of "*Tropheryma whippelii*" and its use for detection of "*T. whippelii*" in clinical specimens by PCR. J Clin Microbiol 2000; 38:2248-2253.
4. Relman DA. 1993. PCR-based detection of the uncultured bacillus of Whipple's disease. p. 496-500. In: Persing, DH; Smith, T; Tenover, FC y White, TJ. (Ed.). Diagnostic molecular microbiology principles and applications. American Society for Microbiology.