

5. La Scola B, Raoult D. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. J Clin Microbiol. 1996;34:2722-7.
6. de Sousa R, Duque L, Anes M, Poças J, Torgal J, Bacellar F, et al. Lymphangitis in a Portuguese patient infected with *Rickettsia sibirica*. Emerg Infect Dis. 2008;14:529-30.
7. Leitner M, Yitzhaki S, Rzutkiewicz S, Keysary A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:166-9.
8. Kuloglu F, Rolain JM, Fournier PE, Akata F, Tugrul M, Raoult D. First isolation of *Rickettsia conorii* from humans in the Trakya (European) region of Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:609-14.
9. Fournier PE, Raoult D. Suicide PCR on skin biopsy specimens for diagnosis of rickettsioses. J Clin Microbiol. 2004;42:3428-34.

Beatriz Fleta-Asín^{a,*}, Leticia Alonso-Castro^a, Isabel Jado-García^b y Pedro Anda-Fernández^b

^a Servicio de Dermatología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

^b Laboratorio de espiroquetas y patógenos especiales, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: beatriz.fleta.trabajo@gmail.com (B. Fleta-Asín).

doi:10.1016/j.eimc.2011.05.011

Bacteriemia por *Bordetella holmesii* en una niña con anemia de células falciformes

Bordetella holmesii bacteremia in a child with sickle cell disease

Sr. Editor:

En la anemia falciforme se produce hipoesplenismo funcional, por lo que es característico el aumento de susceptibilidad a ciertos patógenos bacterianos como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella spp.*, etc¹. Las medidas preventivas tales como la administración profiláctica de penicilina y las vacunaciones, han contribuido a reducir las infecciones causadas por algunos de estos microorganismos². Sin embargo, algunos otros microorganismos como por ejemplo *Bordetella holmesii* (*B. holmesii*) han emergido en estos últimos años.

Niña de 6 años diagnosticada de anemia de células falciformes a los dos meses y medio de edad, en tratamiento con ácido fólico y en profilaxis antibiótica con penicilina oral, correctamente vacunada. La niña fue trasladada al Servicio de Urgencias por presentar fiebre de 36 horas de evolución (máxima: 39,9 °C) que cedía parcialmente con antitérmicos, acompañado de síntomas catarrales y leves mialgias. En la exploración física no se hallaron alteraciones significativas y la analítica mostró leucocitosis ($14,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ con 68,3% neutrófilos) y aumento de reactantes de fase aguda (proteína C reactiva de 4,90 mg/dl). Se extrajeron hemocultivos ($\times 2$) y se inició tratamiento antibiótico empírico con cefotaxima 150 iv mg/kg/día.

Los hemocultivos fueron incubados en el sistema BacT/ALERT[®] 3D (bioMérieux[®]). A las 72 horas de incubación se detectó crecimiento y se observaron bacilos gram-negativos. Se realizaron subcultivos, necesitando 48 horas de incubación a 37 °C para poder visualizar colonias pequeñas y brillantes en agar sangre, chocolate y MacConkey. La actividad catalasa era débil y la oxidasa negativa. Los sistemas de identificación comerciales disponibles (Wider[®] [Francisco Soria Melguizo], API NE[®] y Vitek 2[®] [bioMérieux]) no lograron identificar el microorganismo. La sensibilidad a los antimicrobianos se ensayó mediante E-test en placas de agar Mueller-Hinton y una incubación de 48-72 horas. Las CMI₉₀ fueron: penicilina 16 µg/ml, ampicilina 1,5 µg/ml, amoxicilina-clavulánico 0,38 µg/ml, cefotaxima 8 µg/ml, ceftazidima 0,094 µg/ml, cefepime 0,38 µg/ml, imipenem 0,38 µg/ml, meropenem 0,012 µg/ml, ciprofloxacino 0,19 µg/ml, eritromicina 0,38 µg/ml, gentamicina 0,25 µg/ml, y trimetoprim-sulfametoxazol 0,50 µg/ml. El panel del sistema Wider mostró crecimiento en el control positivo a las 48 horas, y la sensibilidad antimicrobiana de los β-lactámicos fue: amoxicilina ≤ 4 µg/ml, amoxicilina-clavulánico ≤ 4/2 µg/ml, cefotaxima > 8 µg/ml, ceftazidima ≤ 1 µg/ml, y cefepime ≤ 1 µg/ml. Finalmente, se realizó PCR-secuenciación del gen 16S ARNr. La

comparación de la secuencia obtenida con las depositadas en el GenBank mostró un 100% de homología con *B. holmesii* (número de acceso GenBank: DQ409136.1). Durante su ingreso la paciente evolucionó favorablemente a pesar de la resistencia *in vitro* a cefotaxima, cediendo la fiebre en las primeras 24-48 horas. Se decidió el alta hospitalaria 7 días después del ingreso, completándose el tratamiento antibiótico con amoxicilina-clavulánico 80 mg/kg/día por vía oral durante 8 días.

B. holmesii fue aislada por primera vez en un varón esplenectomizado en 1983. Designado inicialmente como CDC non-oxidizer group NO2; finalmente fue reclasificado como *B. holmesii* en 1995. Es un coccobacilo gram-negativo, pleomórfico, aerobio estricto, de crecimiento lento, catalasa variable, inmóvil, asacrolítico, no reduce los nitratos, indol negativo, citrato y ácido sulfhídrico negativos³. Puede ser distinguido de *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella avium* por la pérdida de actividad oxidasa y por la producción de un pigmento marrón-verdoso después de 48 horas de incubación, mientras que el test de ureasa de Christensen la diferenciaría de *B. pertussis*³. Los medios de cultivo y de transporte para *Bordetella* que llevan Charcoal agar con cefalexina (Bordet-Gengou, Regan-Lowe) parece que tienen un efecto inhibitorio sobre *B. holmesii*, lo que podría explicar que en muchos laboratorios no se haya aislado este microorganismo en muestras respiratorias sembradas para *Bordetella*. Algunos factores predisponentes descritos de infección por *B. holmesii* son asplenia (anatómica o funcional), enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal crónica, sida, y artritis reumatoide⁴. Este microorganismo ha sido descrito como causa de bacteriemias, endocarditis, celulitis, artritis séptica, pielonefritis y neumonías⁴⁻⁸. La mayoría de los pacientes suele presentar una buena evolución clínica, siendo excepcional las muertes producidas por este patógeno⁴. En cuanto al modo de transmisión, es desconocido, aunque se han propuesto los animales domésticos como posibles reservorios^{5,7}. Por otra parte, en cuanto a la sensibilidad a los antimicrobianos no existen puntos de corte estandarizados, pero la observación de una CMI elevada de cefotaxima y CMI₉₀ más bajas para el resto de β-lactámicos fueron concordantes con los resultados de Shepard et al⁴. Estos autores estudiaron la sensibilidad *in vitro* de 25 aislamientos de *B. holmesii* que presentaban CMI₉₀ elevadas para las cefalosporinas de tercera generación (CMI₉₀ > 8 µg/ml). Sin embargo, las CMI₉₀ para ampicilina y cefepime fueron de 4 y 2 µg/ml, respectivamente⁴. Aunque se desconoce el posible mecanismo de resistencia de *B. holmesii*, un artículo reciente sobre mecanismos de resistencia a β-lactámicos de *B. bronchiseptica*, en particular a cefalosporinas de tercera generación, señalaba que la combinación de varios mecanismos incluyendo la expresión de una nueva β-lactamasa (BOR-1) podrían ser responsables de este fenotipo de resistencia⁹. Un aspecto a tener en cuenta cuando se realiza diagnóstico molecular de tos ferina utilizando como diana

la región IS481, son las reacciones cruzadas con *B. holmesii* debido a la presencia de esta secuencia de inserción en el genoma de esta bacteria¹⁰. En conclusión, *B. holmesii* es un verdadero patógeno humano a tener en cuenta en aquellos pacientes que tienen como factor de riesgo la asplenia.

Bibliografía

1. Lutvik LI. Infections in asplenic patients. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 3524-32.
2. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. N Engl J Med. 1999;340:1021-30.
3. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MFM, Steigerwalt AG, O'Connor SP, et al. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol. 1995;33:1-7.
4. Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, Patel JB, et al. *Bordetella holmesii* bacteremia: A newly recognized clinical entity among asplenic patients. Clin Infect Dis. 2004;38:799-804.
5. Njamkepo E, Delisle F, Hagege I, Gerbaud G, Guiso N. *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. Clin Microbiol Infect. 2000;6:131-6.
6. Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, Severance PJ, Persing DH. *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. Clin Infect Dis. 1998;26:389-92.
7. Morris JT, Myers M. Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. Clin Infect Dis. 1998;27:912-3.
8. Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H. *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. Emerg Infect Dis. 1999;5:441-3.
9. Lartigue MF, Poirer L, Fortineau N, Nordmann P. Chromosome-Borne Class A BOR-1 β -Lactamase of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2565-7.
10. Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJR. Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. J Clin Microbiol. 2000;38:467.

Laura Barrado^{a,*}, Marta Barrios^b, Francisca Sanz^a
y Fernando Chaves^a

^a Servicio de Microbiología, Hospital Doce de Octubre, Madrid, España

^b Servicio de Pediatría, Hospital Doce de Octubre, Madrid, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ljb550@msn.com (L. Barrado).

doi:10.1016/j.eimc.2011.05.003

Prevalence of high risk genotypes of human papillomavirus in anal samples from men who have sex with men with abnormal cytology in Madrid

Prevalencia de genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano en muestras anales de hombres que tienen sexo con hombres con citología alterada en Madrid

Dear Editor:

The incidence of anal cancer has increased in frequency in these recent years, mainly in risk groups such as men who have sex with men (MSM), HIV-infected patients, immunocompromised men and women, and patients with a history of cervical cancer.¹ Much data have been published to conclude that anal cancer is continuously increasing in HIV-positive MSM despite the use of highly active antiretroviral therapy (HAART) probably because of the longer life expectancy.² Infection with high risk genotypes of human papillomavirus (HR-HPV) is a major risk factor for development of anal cancer.³ In men, 80-85% of anal cancers worldwide are associated with HPV infection.⁴ HR-HPV include 12 genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) and probably HR-HPV include 6 other genotypes (26, 53, 66, 68, 73, 82).⁵ Screening of anal cancer is based on collecting cells for anal cytology followed by a colposcopic examination of the anus and distal rectum (high-resolution anoscopy) for those patients with abnormal cytological results. Early diagnosis and treatment of precancerous anal lesions should decrease the incidence of anal cancer in the same way as the incidence of cervical cancer has been reduced through screening to diagnose and treat severe cervical lesions.

The aim of this study was to determine the prevalence and distribution of HR-HPV in anal samples from MSM with abnormal cytology, as well as the frequency of cytological lesions and its association with the human immunodeficiency virus (HIV) infection.

A total of 100 MSM who attended the Sexual Transmitted Disease Unit of the Ramón y Cajal Hospital were studied from June 2009 to October 2010. Anal samples were collected with cervical brushes (Cervix-Brush®) and stored in PreservCyt® medium. Cytological analyses were performed using the Bethesda classification⁶ and HPV genotypes were detected by PCR (Linear Array®, Roche

Diagnostics, Mannheim, Germany). Statistical analysis were performed with SAS (S.A.S. Institute Inc., Cary, NC).

The mean age of the patients was 35.3 years (range: 17-65 years), 47 (47%) of them were HIV positive. Cytological lesions were only detected in 46 anal samples from 43 patients, and were as follows: 8.7% Atypical Squamous Cell Unknown Significance (ASCUS), 69.5% Low Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL), 8.7% Indeterminate Squamous Intraepithelial Lesion (ISIL) and 13.1% High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL). HIV positive patients had 74% of LSIL and 11% of HSIL versus 63% and 15.7%, respectively in the non HIV-infected ones ($P > .5$). Negative results for HPV were observed in 4 samples with cytological lesions (3 LSIL and 1 ASCUS). Of the HPV positive samples, 93% showed a mixed co-infection (from 2 to 11 genotypes), the coexistence of three or more different genotypes in the same sample (19%) being most frequently observed. In the overall analysis (Table 1), HPV-51 was the most frequent genotype detected (30%), followed by HPV-31 and HPV-66 (both 26%), and finally genotypes HPV-16 and 18 were found in 24% and 13%, respectively. HR-HPV was detected in 80.4% of anal samples (68.4% in HIV negative versus 88.8% in HIV positive, $P = 0.08$). The most frequent HR-HPV in HIV negative and HIV positive patients was HPV-31 and HPV-51 respectively. Both HR-HPV-16 and 31 were the most prevalent genotypes in patients with LSIL, whereas in the group of HSIL these were represented by HPV-51 and HPV-58.

We conclude, that in our study the most prevalent HPV genotype in anal samples of MSM men that presented an abnormal cytology was HPV-51 (almost all in samples from HIV positive patients), followed by HPV-31 and HPV-66. Interestingly, genotypes 16 and 18 were not the most prevalent in anal samples as opposed to cervical samples in our country⁷ and several areas of the world.⁴ None of the patients included in the study had been vaccinated. Infections with multiple genotypes are common. The mean number of genotypes detected in each anal sample in our study is similar to other published studies using the same assay.⁸ Only in 7% of the patients was there a unique genotype present. There is no difference in the frequency of LSIL, HSIL and HR-HPV between HIV negative and positive patients. Thus, we could not demonstrate that HIV infection is associated with the presence of HSIL as stated by other authors.⁹ This can be explained because the immunological