

# Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whippelii*

José Ramón Blanco<sup>a</sup>, Isabel Jado<sup>b</sup>, Mercedes Marín<sup>c</sup>, Isabel Sanfeliu<sup>d</sup>, Aránzazu Portillo<sup>a</sup>, Pedro Anda<sup>e</sup>, Immaculada Pons<sup>d</sup> y José Antonio Oteo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Área de Enfermedades Infecciosas. Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores. Hospital San Pedro CIBIR. Logroño.

<sup>b</sup>Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Servicio de Bacteriología. Unidad de Alertas y Emergencias. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. <sup>c</sup>Servicio de Microbiología Clínica-Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. <sup>d</sup>Laboratorio de Microbiología. Servicio de Análisis Clínicos. UDIAT-Centro Diagnóstico. Corporació Parc Taulí. Sabadell. Barcelona. <sup>e</sup>Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

***Ehrlichia*/*Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whippelii* (antes llamado *whippelii*) constituyen un claro ejemplo de bacterias de difícil cultivo que causan enfermedades emergentes y reemergentes de potencial gravedad e importancia en salud pública. En los últimos años la disponibilidad de técnicas de biología molecular y de cultivo celular ha permitido que muchas de estas especies se hayan implicado en patología humana. El desarrollo de todos estos aspectos, con especial hincapié en las técnicas microbiológicas y criterios diagnósticos, se puede consultar en el procedimiento microbiológico SEIMC número 27: "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whippelii*" (2.<sup>a</sup> ed., 2007) ([www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/](http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/)).**

**Palabras clave:** *Anaplasma*. *Bartonella*. *Rickettsia*. *Tropheryma whippelii*. Técnicas de laboratorio. Procedimientos.

Microbiological diagnosis of emerging bacterial pathogens: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, and *Tropheryma whippelii*

***Ehrlichia*/*Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* and *Tropheryma whippelii* (formerly called *whippelii*) are fastidious bacterial organisms, considered the causative agents of potentially severe emerging and re-emerging diseases with repercussions on public health. The recent availability of advanced molecular biology and cell culture techniques has led to the implication of many of these species in human pathologies. These issues are extensively covered in number 27 of the SEIMC microbiological procedure: "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por**

**patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whippelii*" (Microbiological diagnosis of *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* and *Tropheryma whippelii* infections) (2<sup>nd</sup> ed., 2007) ([www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/](http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/)).**

**Key words:** *Anaplasma*. *Bartonella*. *Rickettsia*. *Tropheryma whippelii*. Laboratory techniques. Procedures.

## Introducción

Las infecciones que se tratan en esta revisión tienen en común, con la excepción de la enfermedad de Whipple, la propiedad de ser vehiculadas por artrópodos vectores (piojos, pulgas, garrapatas, trombicúlidos) y de ser bacterias de difícil cultivo. Esta última característica es la que ha hecho que hasta hace pocos años los diagnósticos microbiológicos se hayan realizado mediante la detección de anticuerpos. En los últimos años la disponibilidad de técnicas de biología molecular y de cultivo celular ha permitido que muchas de estas especies se hayan implicado en patología humana.

## Anaplasmosis humana (ehrlichiosis humana granulocítica)

Con los términos ehrlichiosis y anaplasmosis denominamos a un grupo de infecciones bacterianas transmitidas por garrapatas duras (*Ixodidae*), que afectan a hombres y animales. Son de distribución universal y están causadas por diferentes especies de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, y *Neorickettsia* (familia *Anaplasmataceae*). Taxonómicamente, pertenecen al orden Rickettsiales (alfa<sub>1</sub> proteobacteria), y se caracterizan por ser gramnegativas, pleomórficas y de crecimiento intracelular obligado. Se diferencian de las *Rickettsia* spp. en que se replican en unas vacuolas derivadas de la membrana celular de las células que infectan principalmente leucocitos y plaquetas<sup>1,2</sup>. 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 una especie de agregados citoplasmáticos denominados "mórulas" mediante las tinciones de Wright y Giemsa<sup>1,2</sup>.

Correspondencia: Dr. J.R. Blanco.  
Área de Enfermedades Infecciosas.  
Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores.  
Hospital San Pedro CIBIR.  
Piqueras, 98. 26006 Logroño. España.  
Correo electrónico: jrblanco@riojasalud.es

Manuscrito recibido el 23-1-2008; aceptado el 23-1-2008.

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

Especies de <i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	Diana	Vector	Distribución geográfica
<i>E. chaffeensis</i>	Monocitos	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Dermacentor variabilis</i>	Norteamérica Centroamérica
<i>A. phagocytophilum</i>	Granulocitos	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa Norteamérica Norte de África
<i>E. ewingii</i>	Granulocitos	<i>A. americanum</i>	Norteamérica
<i>N. sennetsu</i>	Monocitos	Desconocido	Japón Malasia

TABLA 2. Propuestas para la definición de casos de anaplasmosis humana del ESCAR

**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 valor de anticuerpos\*  
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 valor estable de anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* en suero agudo y convalescente si el valor es cuatro veces el punto de corte\*\*  
o
3. Resultado de PCR positivo sin posterior secuenciación  
o
4. Presencia de mórulas intracitoplasmáticas en el frotis sanguíneo

\*Por ensayos de inmunofluorescencia, usando tanto antígeno intracelular como purificado, en laboratorio de referencia o con el *kit* de MRL Diagnostics (Cypress, California, EE.UU.).

\*\*Usando los cebadores específicos de especie.

ESCAR: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for *Coxiella*, *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Bartonella*; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

En la tabla 1 se muestran las diferentes especies implicadas en patología humana con sus dianas y vectores. En Europa sólo tenemos constancia de la existencia de la anaplasmosis humana (AH) y la única garrapata implicada en su transmisión es *Ixodes ricinus*, guardando la AH y la enfermedad de Lyme un inminente paralelismo, ya que comparten vector, alguno de los reservorios y como tal, ambiente epidemiológico. La mayor incidencia de estas infecciones se produce en los meses en los que las garrapatas están más activas (primavera-verano y principio de otoño). En Europa llama la atención la alta prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum* encontrada en *I. ricinus* (hasta el 45%) y los pocos casos diagnosticados en humanos.

A pesar de que las dianas de *Ehrlichia chaffeensis*, *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia ewingii*, productoras, respectivamente, de ehrlichiosis humana monocítica, AH y ehrlichiosis humana granulocítica en inmunodeprimidos son diferentes, presentan un cuadro clínico muy superponible. En Europa no existen datos sobre la presencia de otras ehrlichiosis humanas diferentes a AH.

La AH es una enfermedad febril aguda en la que la mayoría de los pacientes recuerdan la picadura de una garrapata en los días o semanas previas. Se han comunicado más casos en varones. El período de incubación varía entre 5 y 21 días. La mayor parte de los casos europeos se producen entre abril y octubre con un pico en julio, lo que coincide con los meses de más actividad de la garrapata. Los pacientes presentan un cuadro febril de comienzo súbito (> 38,5 °C), malestar general, cefalea, mialgias y artralgias. Además pueden existir otras manifestaciones clínicas: respiratorias (tos); digestivas (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal) y neurológicas (meningitis). La presencia de exantema es excepcional. En la AH europea las manifestaciones clínicas parecen menos graves que en las series americanas. Algunos casos de AH se presentan como una neumonía atípica. Entre las complicaciones de estas afecciones se han descrito, entre otras, coagulación intravascular diseminada (CID), distrés respiratorio del adulto, neuropatías periféricas, parálisis facial y rabdomiolisis. La inmunodepresión (leucopenia) provocada en ocasiones se puede complicar con el desarrollo de infecciones oportunistas (neumonía micótica) que pueden ser mortales. En Norteamérica el 0-5% de los pacientes fallece y la mayoría de las muertes se debe a infecciones oportunistas o a enfermedades concomitantes, aspectos no descritos en la literatura médica europea<sup>2</sup>. Durante la fase aguda la mayoría de los pacientes presenta leucopenia, trombopenia y una elevación moderada de las transaminasas. Estas alteraciones se suelen resolver en la AH europea en unos 14 días. En los pacientes con signos meníngeos el líquido cefalorraquídeo (LCR) suele ser normal<sup>2</sup>.

Se puede dar el caso de que coexista más de una infección transmitida por garrapatas en un mismo paciente, ya que *I. ricinus* transmite también la enfermedad de Lyme, la babesiosis y la encefalitis centroeuropea. En la tabla 2 se recogen los criterios diagnósticos de AH.

**Técnicas diagnósticas**

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 debe ser extraída preferiblemente en tubos de ácido etilendiaminotetraacé-

tico (EDTA), y preservada a temperatura ambiente no más de 48 h o congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$ . No se recomienda utilizar tubos de estos tubos, ya que comprometen su posterior utilización para la posible amplificación del genoma mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa [PCR]<sup>3</sup>. En el caso de afectación neurológica se debe recoger LCR. En la tabla 3 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología. Dado que la carga microbiana en este tipo de infecciones es menor que en el caso de otras bacterias, se debe recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo.

### Observación de mórulas

Para su observación lo mejor es preparar las extensiones de sangre periférica inmediatamente tras la extracción de sangre. Deben secarse al aire y conservarse a temperatura ambiente para su observación. La sensibilidad es muy baja en Europa<sup>3</sup>.

### Cultivo

Se realiza en muy pocos centros y exige un laboratorio con un nivel mínimo de seguridad de tipo 3. La línea celular más empleada para el cultivo es la de células promilo-cíticas leucémicas HL-60. La infección puede ser comprobada mediante tinciones de Giemsa, y las mórulas son visibles a los 3-7 días de la inoculación o mediante PCR<sup>3</sup>.

### Detección molecular

Estos métodos no están estandarizados y pueden mostrar resultados discrepantes. Se ha logrado la detección de ADN de *A. phagocytophilum* de sangre y de suero en fase aguda. En la actualidad se dispone de múltiples dianas, siendo las más sensibles las que amplifican un fragmento del gen *16S ARNr*<sup>3</sup>.

### Serología

Es la técnica más utilizada y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la más empleada. Disponemos de diferentes antígenos para el diagnóstico de la AH. Su mayor limitación es la existencia de reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Al no existir en Europa ninguna evidencia que demuestre la presencia de

TABLA 3. Muestras necesarias para el diagnóstico de *Anaplasma*, *Bartonella* y *Tropheryma whipplei*

Muestra	Recogida	Transporte (tiempo y temperatura)	Conservación (tiempo y temperatura)	Prueba diagnóstica	Nota
<b>Muestras comunes para el diagnóstico de <i>Anaplasma</i>, <i>Bartonella</i> y <i>T. whipplei</i></b>					
Suero	Tubo de serología	$\leq 24$ h, $2-8^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, $-20^{\circ}\text{C}$	IFI	
Sangre con EDTA	Tubo con EDTA	$\leq 48$ h, TA $+48$ h, $-20^{\circ}\text{C}$	$+48$ h, $-20^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	PCR	
Sangre citratada	Tubo con citrato	$\leq 48$ h, TA $+48$ h, $-20^{\circ}\text{C}$	$+48$ h, $-20^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	PCR	
<b>Otras muestras necesarias para el diagnóstico de <i>Anaplasma</i></b>					
Sangre heparinizada	Tubo con heparina	$\leq 24$ h, TA $+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	Cultivo <sup>a</sup>	<sup>b</sup>
<b>Otras muestras necesarias para el diagnóstico de <i>Bartonella</i></b>					
Biopsia <sup>c</sup> , hemocultivo <sup>d</sup>	De manera aséptica, enviar al laboratorio con agua destilada	$\leq 24$ h, TA $+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	Cultivo, PCR	
<b>Otras muestras necesarias para el diagnóstico de <i>T. whipplei</i></b>					
Sangre heparinizada	Tubo con heparina	$\leq 24$ h, TA $+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	Cultivo <sup>a</sup>	<sup>b</sup>
Biopsia de órganos afectados	De manera aséptica, enviar al laboratorio con agua destilada	$\leq 24$ h, TA $+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	Cultivo, PCR, inmunohistología	
Líquidos estériles	De manera aséptica, enviar al laboratorio con agua destilada	$\leq 24$ h, TA $+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, $-80^{\circ}\text{C}$ (no varias descongelaciones)	Cultivo, PCR	

<sup>a</sup>Muy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de bioseguridad 3.

<sup>b</sup>Evitar el uso de heparina para muestras en las que se vaya a realizar diagnóstico molecular, puesto que este anticoagulante puede inhibir la PCR.

<sup>c</sup>Ganglios o adenopatías, válvulas cardíacas, piel, etc.

<sup>d</sup>Inmunodeprimidos o con sospecha de endocarditis.

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético; IFI: inmunofluorescencia indirecta; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

otras ehrlichiosis humanas diferentes de AH, ante un cuadro clínico sugestivo, una serología positiva ha de hacernos pensar en AH. También se han descrito reacciones cruzadas con otros *Rickettsiales*. Su limitación es la falta de sensibilidad en fases agudas. Se debe extraer un segundo suero (de 14 a 21 días) para observar seroconversión<sup>3</sup>.

El diagnóstico de la anaplasmosis/ehrlichiosis requiere un alto índice de sospecha. Los hallazgos de laboratorio (trombopenia, leucopenia, aumento de transaminasas) y los antecedentes epidemiológicos nos deben hacer sospechar esta posibilidad. Estas infecciones han de ser tenidas en cuenta en individuos previamente sanos que presentan fiebre tras realizar actividades al aire libre y en aquéllos con el antecedente de picadura de garrapata y que no responden al tratamiento con betalactámicos o macrólidos, especialmente en áreas endémicas para la enfermedad de Lyme.

Las anaplasmosis/ehrlichiosis se previenen evitando la picadura de las garrapatas. Ante la sospecha clínica se debe iniciar tratamiento de forma empírica. El tratamiento de elección, incluido los menores de 8 años, es la doxiciclina. En embarazadas el tratamiento de elección es rifampicina. La respuesta al tratamiento es buena y los síntomas se resuelven en 24-48 h. En ausencia de respuesta se ha de descartar otras posibilidades diagnósticas o coinfección por otros agentes<sup>2</sup>.

## Infección por *Bartonella* spp.

Las *bartonellas* son bacterias gramnegativas, aerobias, no móviles, que se comportan como intracelulares facultativas. Hasta 1993 *Bartonella bacilliformis* era la única especie de *Bartonella* implicada en patología humana. En los últimos años, las técnicas de biología molecular y de cultivo han permitido implicar en patología humana a casi una decena de especies de *Bartonella* (tabla 4)<sup>4</sup>. Las principales especies implicadas en nuestro país en patología humana son *B. henselae* y *B. quintana*.

Una de las características de las infecciones por *Bartonella* spp. consiste en que una misma especie puede producir diferentes manifestaciones clínicas<sup>4</sup>. *B. henselae* es el agente principal responsable de la enfermedad por arañazo de gato (EAG). Entre 1 y 3 semanas después de haber sufrido un arañazo y/o mordedura por gatos/perros, el 60-90% de los pacientes presenta una pápula o pústula en la zona de inoculación que se acompañan en el 85-100% de los casos de adenopatías locorreregionales (axilares, cer-

vicales o inguinales). El proceso suele ser benigno y en la mayoría de los casos se resuelve de forma espontánea. *B. quintana* es el agente responsable de la fiebre de las trincheras o fiebre de los 5 días (quintana). Unos 15-25 días después de sufrir una picadura por piojos los pacientes presentan fiebre, cefalea e intensos dolores óseos (pretibiales). La fiebre evoluciona cada 5 días, pero en cada brote es menos intensa que en la anterior. En la actualidad estamos asistiendo a un rebrote de la misma (*urban trench fever*) en vagabundos y alcohólicos<sup>5</sup>. *B. henselae* y *B. quintana* son los agentes responsables de la angiomasitosis bacilar (AB). Se trata de un proceso proliferativo vascular que afecta a la piel (úlceras, nódulos o pápulas hiperpigmentadas, no pruginosas, que sangran con facilidad) o a otros órganos (médula ósea, bazo, hígado). Produce lesiones óseas líticas muy dolorosas. El cuadro clínico se da fundamentalmente en inmunodeprimidos (VIH < 100 CD4). Un cuadro asociado al anterior es la peliosis hepática. Se trata de una lesión parenquimatosa hepática que cursa con dilatación de las sinusoides hepáticas. En estos pacientes está contraindicada la biopsia hepática. *B. henselae* es la única especie implicada. Mención especial merecen las endocarditis por *bartonella*. Estas endocarditis cursan con cultivo negativo (ECN). En la actualidad, y según series, representan hasta el 17% de todos los casos de endocarditis. *B. quintana* es la especie implicada con más frecuencia (hasta en el 80%)<sup>4,6</sup>. Los pacientes con endocarditis por *B. quintana* no presentan valvulopatía previa, a diferencia de lo que se observa en la debida a *B. henselae*<sup>4,6</sup>. Desde el punto de vista clínico, la clínica es superponible al resto de las endocarditis. Es importante conocer que existen reacciones cruzadas entre *Bartonella* spp. y *Chlamydia* spp.<sup>7</sup>, por lo que ante una endocarditis por *Chlamydia* spp. se debe descartar que no corresponda en realidad a una endocarditis por *Bartonella* spp. Por último, debemos estar atentos a la infección por *B. bacilliformis* en pacientes procedentes de Sudamérica (en especial de los Andes peruanos). La fiebre de Oroya es su forma aguda (fiebre elevada, escalofríos, artralgias, estupor). Se debe a la invasión masiva de los eritrocitos por *B. bacilliformis*, lo que origina su hemólisis. La forma crónica es la verruga peruana y se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas de aspecto vascular que sangran con facilidad.

## Técnicas diagnósticas

El diagnóstico microbiológico se basa en técnicas serológicas, de PCR y el cultivo<sup>7</sup>. En la tabla 3 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de

TABLA 4. Especies de *Bartonella* implicadas en patología humana

Especies de <i>Bartonella</i>	Vector	Reservorio	Manifestaciones clínicas
<i>B. alsatica</i>	Desconocido	Conejos	Endocarditis
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia verrucarrun</i>	Hombre	Enfermedad de Carrión, verruga peruana, bacteriemia
<i>B. clarridgeiae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gatos	EAG
<i>B. elizabethae</i>	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Ratas	Endocarditis
<i>B. grahamii</i>	<i>Ctenophthalmus nobilis</i>	Ratón campestre	Neurorretinitis
<i>B. henselae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gatos	EAG, angiomasitosis bacilar, endocarditis, peliosis hepática
<i>B. koehlerae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gatos	Endocarditis
<i>B. quintana</i>	<i>Pediculus humanus</i>	Hombre	Fiebre de las trincheras, angiomasitosis bacilar, linfadenopatía crónica, endocarditis
<i>B. vinsonii</i> ssp. <i>berkhoffii</i>	Desconocido	Perros, coyotes	Endocarditis
<i>B. vinsonii</i> ssp. <i>arupensis</i>	Desconocido	Roedores	Endocarditis

EAG: enfermedad por arañazo de gato.

diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología.

### Serología

Es la técnica más utilizada (IFI, ELISA). La presencia de variantes antigénicas (*B. henselae* Houston, *B. henselae* Marsella) puede explicar la existencia de discordancias serológicas. También se debe estar atento a la posibilidad de reacciones cruzadas con otras especies (*Chlamydia*, *Coxiella burnetii*)<sup>7</sup>. El punto de corte diagnóstico para pacientes con EAG es IgG 1:64 y para los de endocarditis, 1:800.

### Detección molecular

La amplificación mediante PCR de los genes de la citrato sintasa (*gltA*) y de la fracción 16S del ARN ribosomal son útiles para su diagnóstico. Otro cebador útil para la diferenciación de las especies de *Bartonella* spp. es la que emplea los primeros complementarios de la región intergénica del 16S-23S ARNr. La PCR en tiempo real es más sensible y específica y es especialmente útil en pacientes con endocarditis por *Bartonella* spp. en los que sólo se dispone de suero<sup>8</sup>.

### Cultivo

Aunque estas bacterias son consideradas microorganismos exigentes o fastidiosos, pueden ser cultivadas en agar sangre con un 5% de sangre de cordero o agar chocolate. Su cultivo requiere de incubaciones prolongadas, en una atmósfera enriquecida con CO<sub>2</sub> (5%) y a una temperatura de 37 °C (excepto *B. bacilliformis* que sólo crece a 28-30 °C)<sup>4</sup>. 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 mínimo de 2 meses. Los subcultivos de *Bartonella* spp. precisan de 3 a 10 días. La rentabilidad diagnóstica mejora si antes del cultivo se someten los tubos de sangre a congelación (24 h a -85 °C) y posterior descongelación a temperatura ambiente, ya que lisa los hematíes, o bien si se emplean hemocultivos de lisis-centrifugación, que lisa directamente los hematíes. Dado que estas bacterias producen poco CO<sub>2</sub>, es posible que el sistema de hemocultivos automatizado no detecte el crecimiento de bacterias, por lo que en aquellos casos en los que se sospeche la infección se debe realizar una siembra en un medio sólido que se debe mantener de forma prolongada.

El tratamiento depende de cada especie y de las manifestaciones clínicas que produzca<sup>4</sup>. En algunos casos, como la EAG, no suele ser preciso el uso de antibióticos. En la fiebre de las trincheras se utiliza doxiciclina y gentamicina; en la AB, eritromicina. En los pacientes con ECN en los que se sospeche la infección por *Bartonella* spp. una opción consiste en administrar gentamicina junto con ceftriaxona asociado o no a doxiciclina. Por último, en pacientes con fiebre de Oroya el tratamiento de elección es el cloranfenicol y en los que presentan la verruga peruana, la rifampicina.

## Infecciones por *Rickettsia* spp.

El género *Rickettsia* está constituido por especies de pequeños cocobacilos gramnegativos pleomórficos, inmóviles y aerobios que se comportan como patógenos intracelu-

lares obligados y están relacionados serológicamente. Se tiñen razonablemente bien con los métodos de Giemsa, Castañeda y Giménez y débilmente con la tinción de Gram.

Las rickettsiosis constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución geográfica heterogénea cuya gravedad 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 infectados por el microorganismo. El hombre es un huésped accidental en el ciclo biológico de las *rickettsias*. Diversos mamíferos, fundamentalmente pequeños roedores, ganado y perros, contribuyen a perpetuar la infección y cerrar el ciclo biológico de la bacteria. Un hecho de especial interés con 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 vector. Hasta el año 1991 sólo se conocían cinco enfermedades rickettsiales<sup>9,10</sup>. Desde entonces, gracias al desarrollo de los métodos de cultivo y de las técnicas de biología molecular, se han descrito otras muchas (tabla 5). Las rickettsias se clasifican en dos grupos atendiendo a las bases clínicas y a los agentes etiológicos responsables: el grupo de las fiebres manchadas (GFM) y el de las fiebres tíficas (GFT) (tabla 5). Las rickettsias pertenecientes al GFM muestran una distribución global. La mayoría se transmite por garrapatas y están muy relacionadas serológicamente. Los representantes del GFT son dos: *R. prowazekii*, responsable del tifus exantemático epidémico, y *R. typhi*, que produce el llamado tifus murino o endémico.

Los principales síntomas de una rickettsiosis aparecen a los 6-10 días después de la picadura y se caracterizan por cefalea, erupciones maculopapulares, dolores musculares, linfadenopatía local y una o varias escaras en el punto de inoculación<sup>9,10</sup>. 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. En los casos más graves, las rickettsiosis suelen ir acompañadas de edema pulmonar, neumonía intersticial y erupción hemorrágica. Las alteraciones del sistema nervioso central suelen ser relativamente frecuentes y pueden provocar distintos cuadros clínicos. Algunas de ellas derivan en importantes secuelas como sordera, pérdida de visión y paroplejía, entre otros defectos neurológicos<sup>9,10</sup>.

### Técnicas diagnósticas

El diagnóstico microbiológico se basa en técnicas serológicas, de PCR y el cultivo<sup>9,11</sup>. En la tabla 6 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología.

### Tinción de Giménez

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

TABLA 5. Rickettsiosis de las fiebres manchadas y del grupo tífus

Enfermedad	Microorganismo	Vector	Distribución
<b>Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas</b>			
Fiebre botonosa	<i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mediterráneo, África, India, Mar Negro
DEBONEL/TIBOLA	<i>R. slovacae</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	Europa
Fiebre manchada de Israel	<i>R. conorii israelensis</i>	<i>R. sanguineus</i>	Israel, Portugal
Rickettsiosis asociada a linfangitis	<i>R. sibirica mongolitimonae</i>	<i>Hyalomma asiaticum</i> , <i>H. truncatum</i>	China, África, Francia
Innominada	<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa, Japón
Innominada	<i>R. aeschlimannii</i>	<i>H. marginatum</i> , <i>R. apendiculatus</i>	Europa, África
Innominada	<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Francia
Fiebre por garrapatas en África	<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> , <i>A. variegatum</i>	África, Isla de Guadalupe
Fiebre de Astracán	<i>R. conorii caspiensis</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. pumilio</i>	Astracán, Kosovo, Chad
Tífus garrapatas Norte de Asia	<i>R. sibirica</i>	<i>D. nutalli</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>D. silvarum</i>	Antigua URSS, Pakistán
Innominada	<i>R. heilongjiangensis</i>	<i>D. silvarum</i>	China, Este de Rusia
Fiebre manchada de Japón	<i>R. japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i> , <i>D. taiwanensis</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Japón
Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	<i>R. rickettsii</i>	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. cajennensis</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>R. sanguineus</i>	América
Innominada	<i>R. parkeri</i>	<i>A. maculatum</i>	EE.UU.
Tífus garrapatas Queensland	<i>R. australis</i>	<i>I. holocyclus</i> , <i>I. tasmanii</i>	Australia
Fiebre manchada Islas Flinders	<i>R. honei</i>	<i>Aponomma hydrosauri</i>	Australia, Tailandia
Innominada	<i>R. marmionii</i>	Desconocido	Australia
Rickettsiosis pustulosa	<i>R. akari</i>	<i>Allodermanyssus sanguineus</i>	EE.UU., Ucrania, Turquía
Tífus murino	<i>R. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>C. canis</i>	EE.UU., México, Europa
Innominada	<i>Candidatus R. kellyi</i>	Desconocido	India
Innominada	<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	España
<b>Rickettsiosis del grupo tífus</b>			
Tífus exantemático	<i>R. prowazekii</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	Universal
Tífus murino	<i>R. typhi</i>	<i>Xenopsylla cheopi</i> , <i>C. felis</i>	Universal

### Serología

La serología está limitada por las reacciones cruzadas entre el GFM y el GFT<sup>9,11</sup>. La IFI es una de las técnicas más sensibles y la más ampliamente utilizada en la actualidad para el diagnóstico de las rickettsiosis exantemáticas. Los antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diluciones seriadas del suero del paciente. La confirmación del diagnóstico requiere detectar una seroconversión, que se produce en la fase de convalecencia, entre la tercera y cuarta semanas. 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<sup>9,12</sup>. Este método da como resultado un considerable aumento de la especificidad, si bien tiene una baja sensibilidad.

### Cultivo

Para el cultivo de las rickettsias del GFM se requiere Minimum Essential Medium (medio MEM) sin antibiótico suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (concentración final [CF]), 2 mM de glutamina CF y el 0,2% (CF) de

aminoácidos no esenciales. La incubación de los cultivos se lleva a cabo a 33-35 °C en ausencia de CO<sub>2</sub>. 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<sup>9,11,13</sup>. El cultivo se 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 postinoculación, 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, requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3. Su principal limitación es su baja sensibilidad, por lo que se no se recomienda en el caso de que el paciente haya comenzado con la antibioterapia. Sin embargo, es la técnica diagnóstica más específica, fundamental para la obtención de antígenos, para el estudio de la sensibilidad a antibióticos y la determinación de las especies de *Rickettsia* presentes en un área.

TABLA 6. Muestras necesarias para el diagnóstico de las rickettsiosis

Muestra	Recogida	Transporte (tiempo y temperatura)	Conservación (tiempo y temperatura)	Prueba diagnóstica	Nota
Suero	Tubo de suero	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	IFI	
Sangre con EDTA	Tubo con EDTA	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	PCR	El EDTA <sup>a</sup> dificulta el cultivo
Sangre citratada	Tubo con citrato	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -60/-80 °C (no varias descongelaciones)	PCR, Cultivo <sup>b</sup>	
Sangre heparinizada	Tubo con heparina	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -60/-80 °C (no varias descongelaciones)	Cultivo	La heparina <sup>c</sup> puede inhibir la PCR
LCR	Tubo estéril	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	PCR	
Biopsia cutánea	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	Microscopia <sup>d</sup> , PCR	Muestra de la escara de inoculación
Contenido de pápulas/máculas	Tubo/torunda estéril	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	PCR	

<sup>a</sup>El EDTA levanta la monocapa de células Vero dificultando el cultivo.

<sup>b</sup>Muy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3, por lo que sólo se realiza en laboratorios de referencia e investigación.

<sup>c</sup>Evitar el uso de heparina para muestras en las que se vaya a realizar diagnóstico molecular, puesto que este anticoagulante puede inhibir la PCR.

<sup>d</sup>Previo tinción de tejido infectado, incluyendo la lesión de inoculación, por el método de Giménez.

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético; IFI: inmunofluorescencia indirecta; LCR: líquido cefalorraquídeo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

### Detección molecular

Las técnicas moleculares, como la PCR, permiten un diagnóstico rápido y específico al detectar ADN de rickettsia en tejidos infectados, cultivos y garrapatas. 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 *rOmpB* (presente en todas las especies excepto *R. helvetica*, *R. bellii* y *R. massiliae*)<sup>9,11,14,15</sup>. También se utiliza 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 (*reverse line blotting*) que utiliza como diana el espacio intergénico 23S-5S ARNr<sup>16</sup> que, junto con 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 busque una mayor sensibilidad, hay que recurrir a PCR anidadas y posterior hibridación en fase reversa. La PCR a tiempo real permite obtener resultados en muy poco tiempo (menos de 1 h)<sup>17</sup>. 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.

Las rickettsiosis se previenen evitando la picadura de los artrópodos vectores. El tratamiento de las rickettsiosis debe iniciarse sobre la base proporcionada por datos

clínico-epidemiológicos. El tratamiento de elección para la infección por rickettsias es la doxiciclina. En niños puede utilizarse en algunos casos la azitromicina.

### Enfermedad de Whipple

La enfermedad de Whipple (EW) es una infección multisistémica causada por *Tropheryma whipplei*, un bacilo grampositivo aerobio que no tiñe bien con la tinción de Gram. Gracias a las modernas técnicas de biología molecular esta bacteria ha sido incluida dentro del grupo de los actinomicetos.

Por el momento no se conoce su incidencia real. Afecta, principalmente, a varones de mediana edad, raza blanca y origen europeo que residen en el medio rural. Como muchas enfermedades infecciosas, la EW cursa con signos y síntomas poco específicos. Los síntomas más frecuentes son la pérdida de peso (85-100%), la diarrea con signos de malabsorción (72-85%), las artralgias (simétricas, migratorias) (65-90%) y el dolor abdominal (60-72%)<sup>18</sup>. Otras manifestaciones son las neurológicas (oftalmoplejía supranuclear, mioclonías), cardíacas (ECN) y la hiperpigmentación de la piel.

### Técnicas diagnósticas

El diagnóstico es 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. En la tabla 3 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología.

### Cultivo

En el año 2000 se consigue su cultivo gracias al empleo de medios celulares con líneas de fibroblastos humanos<sup>19</sup>. En los cultivos celulares se multiplica activamente en el interior de las células, pero sobrevive tanto intracelular como extracelularmente, por lo que no se trata de un patógeno intracelular estricto.

### Detección molecular

El estudio por PCR de la región ITS 16S-23S (*internal transcribed spacer*) y del dominio III del gen que codifica el 23S ARNr de varias cepas descritas ha demostrado cierta heterogeneidad; se han descrito cuatro genotipos. Los métodos basados en PCR son, por el momento, los únicos abordables en laboratorios de diagnóstico microbiológico que permiten confirmar su diagnóstico, ya que el cultivo y la serología sólo están disponibles en laboratorios de investigación y la microscopía electrónica no es fácilmente abordable. Por el momento, no existen técnicas comerciales de PCR para su detección. Las PCR empleadas se basan en la amplificación de distintas regiones de su genoma, aunque hay pocas referencias a la sensibilidad y especificidad de cada una<sup>20</sup>. La PCR realizada en formato convencional, *semi-nested-PCR* o *nested-PCR* incrementan la sensibilidad de detección y la PCR a tiempo real con sondas tipo Taqman o FRET aporta mayor especificidad. Del mismo modo, se han empleado iniciadores para diversas regiones; las más utilizadas son las PCR específicas del gen *16S ARNr*, *rpoB*, *hsp65*, el dominio III del ARNr 23S, la región intergénica 16S-23S ARNr y regiones repetidas del genoma<sup>20</sup>. La detección de la bacteria por PCR universal del gen *16S rARN* y su posterior 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*. Recientemente, se han publicado algoritmos para ayudar al diagnóstico de la EW considerando los resultados de la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) y del análisis por PCR<sup>21</sup>. Hay autores que consideran la PCR 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 sistema nervioso central (SNC). Otros recomiendan realizar conjuntamente las dos técnicas, ya que consideran que la tinción de PAS tiene falsos negativos y no es completamente específica de la EW. Si ambas técnicas (PCR y PAS) 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 dos 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. La detección de *T. whipplei* por PCR se debe realizar siempre en muestras de válvulas cardíacas de pacientes con ECN<sup>22</sup>.

Sin tratamiento antibiótico, la enfermedad tiene una evolución fatal. Por el momento no hay ensayos clínicos ni estudios comparativos y prospectivos sobre su tratamiento. El tratamiento recomendado consiste en ceftriaxona o

penicilina G asociada a estreptomocina durante 2 semanas seguido de un tratamiento oral, durante al menos 1 año, con cotrimoxazol. En los alérgicos a las sulfamidas se puede sustituir el cotrimoxazol por doxiciclina asociada a hidroxycloerquina<sup>4</sup>. En la mayoría de los pacientes el tratamiento antibiótico conduce a una rápida mejoría de los síntomas. La efectividad del tratamiento se puede monitorizar mediante la PCR de *T. whipplei*, que se hace negativa a las 2 semanas del inicio del tratamiento.

### Bibliografía

- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, 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;51:2145-65.
- Oteo JA, Brouqui P. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:375-80.
- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, et al. ESCMID Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:1108-32.
- Blanco JR, Raoult D. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;25:313-20.
- Brouqui P, La Scola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patient. *N Engl J Med*. 1999;340:184-9.
- Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, Mainardi JL, Eykyn SJ, Nash J, et al. Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis. *Arch Intern Med*. 2003;163:226-30.
- Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reaction between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2283-7.
- Zeaiter Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol*. 2003;41:919-25.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Rev*. 1997;10:694-719.
- Blanco JR, Oteo JA. Rickettsiosis in Europe. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:26-33.
- La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2715-27.
- Eremeeva ME, Balayeva NM, Raoult D. Serological response of patients suffering from primary and recrudescent typhus: comparison of complement fixation reaction, Weil-Felix test, microimmunofluorescence, and immunoblotting. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1:318-24.
- 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.
- Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein ompA. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:839-49.
- 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;50:1449-55.
- Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso MI, Sousa R, García-Pérez AL, et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4572-6.
- Svraka S, Rolain J, Bechah Y, Gatabazi J, Raoult D. *Rickettsia prowazekii* and real-time polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:428-32.
- Durand DV, Lecomte C, Cathébras P, Rousset H, Goudeau P. Whipple disease: clinical review of 52 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1997;76:170-84.
- Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*. 2000;342:620-5.
- Fenollar F, Raoult D. Molecular techniques in Whipple's disease. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001;1:299-309.
- Fenollar F, Puechal X, Raoult D. Whipple's disease. *N Engl J Med*. 2007;356:55-66.
- Marín M, Muñoz P, Sánchez M, Del Rosal M, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E. *Tropheryma whippelii* infective endocarditis as the only manifestation of Whipple's disease. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2078-81.