Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(10):778–786

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc

Cartas científicas

## Detección de *Rickettsia sibirica mongolotimonae* en biopsia de piel de exantema mediante reacción en cadena de polimerasa: descripción de un caso

### *Detection by polymerase chain reaction of Rickettsia sibirica mongolotimonae in the skin biopsy of a rash: a case report*

*Sr. Editor:*

Presentamos el caso de un varón de 73 años con lesión cutánea en espalda atribuida a picadura, 10 días antes, mientras trabajaba en un huerto de la comunidad de Madrid en el mes de agosto. Unos días después presentó fiebre de hasta 39 °C y nuevas lesiones cutáneas en tronco y extremidades, sin respuesta a tratamiento con amoxicilina/clavulánico. A la exploración presentaba escara negra en región dorso lumbar izquierda y un exantema papuloso eritematoso en tronco y extremidades. El resto de la exploración fue normal. En el análisis de sangre no se encontraron hallazgos de interés. Con la sospecha clínica de rickettsiosis, se extrajo sangre para estudio serológico y se tomaron muestras del exantema papuloso para examen histológico y análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en laboratorio de referencia. Se prescribió tratamiento con doxiciclina oral (100 mg/día, durante 7 días) con mejoría progresiva hasta resolución completa sin secuelas. La serología en fase aguda mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) mostró títulos bajos de inmunoglobulina (Ig) G frente a *Rickettsia conorii*, y negativos de IgM. Una nueva serología realizada 4 semanas más tarde no mostró variaciones. En la biopsia cutánea se observó un infiltrado linfohistiocitario y fenómenos de vasculitis. El estudio mediante PCR de la biopsia cutánea detectó la presencia de *Rickettsia sibirica mongolotimonae*.

El género *Rickettsia* está constituido por cocobacilos gramnegativos pleomórficos que se comportan como patógenos intracelulares obligados. En los últimos años, gracias al desarrollo de los métodos de cultivo y técnicas de biología molecular se han descrito varias especies y vectores implicados.

*Rickettsia sibirica mongolotimonae* se ha descrito recientemente como una subespecie de *R. sibirica*. Su patogenicidad se ha comprobado en humanos, se distribuye principalmente en países del sur de Europa, y ha sido descrito un único caso en España[1]. Basándose en el estudio de nueve casos, se encontró que la infección por *Rickettsia sibirica mongolotimonae* difería del resto de rickettsiosis del área mediterránea por incidir principalmente en primavera, la presencia de dos escaras en dos pacientes, adenopatía regional en 5 de ellos, y la existencia de trayecto linfangítico en 4 pacientes[2].

El diagnóstico microbiológico de las rickettsiosis se basa en técnicas de cultivo, serología y PCR. En cuanto a la serología, la IFI es una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de las rickettsiosis exantemáticas; para confirmarlo es preciso detectar seroconversión considerando la reactividad basal de la población en zonas endémicas. La PCR es una técnica molecular que detecta ADN de *Rickettsia* en tejidos infectados, cultivos y vectores. Los genes más comúnmente analizados son los que codifican dos proteínas de membrana externa: *rOmpA* (ausente en las especies del grupo Tifus [GT] y en *R. belli*, y presente en todas las especies del Grupo de las Fiebre Manchadas [GFM] excepto *R. helvetica*); y *rOmpB* (presente en todas las especies excepto *R. canadensis* y *R. bellii*). También se utiliza el gen *gltA*, que codifica la proteína citrato sintasa (válido para todas las *Rickettsias*), y el gen D (presente en todas las especies excepto *R. canadensis* y *R. bellii*)[3]. En nuestro caso, la muestra cutánea se estudió mediante PCR para amplificación de un fragmento del espacio intergénico 23S-5S ARNr y posterior hibridación en fase reversa *(reverse line blotting)* con sondas especie específicas[4].

La biopsia cutánea como muestra para la detección de *Rickettsia* por métodos moleculares se ha descrito: la mayoría de revisiones o casos consideran la escara de inoculación como muestra, o bien no especifican su procedencia[3,5,6]. Sin embargo, existen artículos que muestran detección de diversas especies de *Rickettsia* en biopsia cutánea del exantema mediante PCR que amplifica diverso material génico, como el gen que codifica la proteína de 17-kD (RCANT17K)[7], las secuencias génicas *OmpA* y *gltA*[8] u otros fragmentos de ADN descritos[9].

Describimos un nuevo caso de rickettsiosis por *Rickettsia sibirica mongolotimonae* en España, con la peculiaridad de que el diagnóstico se realizó mediante PCR en biopsia de piel del exantema y no de la escara de inoculación. Constatamos que la técnica de IFI en suero no fue útil en nuestro caso, pues detectó positividad de tipo IgG que no varió en el tiempo, y que puede interpretarse como reactividad cruzada entre distintas especies de *Rickettsia* o bien inmunidad adquirida en el pasado. Concluimos que el estudio del exantema cutáneo mediante PCR para el diagnóstico de la Rickettsiosis es un método a considerar, sobre todo en casos de sospecha clínica y ausencia de escara de inoculación.

## Bibliografía

1. Aguirrebengoa K, Portillo A, Santibáñez S, Marín JJ, Montejo M, Oteo JA. Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Spain. Emerg Infect Dis. 2008;14:528–9.
2. Fournier PE, Gouriet F, Brouqui P, Lucht F, Raoult D. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. Clin Infect Dis. 2005;40:1435–44.
3. Blanco JR, Jado I, Marín M, Sanfeliu I, Portillo A, Anda P, et al. Microbiological diagnosis of emerging bacterial pathogens: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, and *Tropheryma whipplei*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26:573–80.
4. 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.

0213-005X/$ – see front matter © 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

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, Rzotkiewicz 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,* etc[1]. Las medidas preventivas tales como la administración profiláctica de penicilina y las vacunaciones, han contribuido a reducir las infecciones causadas por algunos de estos microorganismos[2]. 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 × $10^3$/μl con 68,3% neutrófilos) y aumento de reactantes de fase aguda (proteína C reactiva de 4,90 mg/dl). Se extrajeron hemocultivos (×2) y se inició tratamiento antibiótico empírico con cefotaxima 150 iv mg/kg/día.

Los hemocultivos fueron incubados en el sistema BacT/ALERT® 3D (bioMerieux®). 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 CMIs 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 cocobacilo gram-negativo, pleomórfico, aerobio estricto, de crecimiento lento, catalasa variable, inmóvil, asacarolítico, no reduce los nitratos, indol negativo, citrato y ácido sulfhídrico negativos[3]. 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 reumatoide[4]. Este microorganismo ha sido descrito como causa de bacteriemias, endocarditis, celulitis, artritis séptica, pielonefritis y neumonías[4–8]. La mayoría de los pacientes suele presentar una buena evolución clínica, siendo excepcional las muertes producidas por este patógeno[4]. 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 CMIs más bajas para el resto de β-lactámicos fueron concordantes con los resultados de Shepard et al[4]. Estos autores estudiaron la sensibilidad *in vitro* de 25 aislamientos de *B. holmesii* que presentaban CMIs elevadas para las cefalosporinas de tercera generación ($CMI_{90}$ > 8 μg/ml). Sin embargo, las $CMI_{90}$ para ampicilina y cefepime fueron de 4 y 2 μg/ml, respectivamente[4]. 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 resistencia[9]. Un aspecto a tener en cuenta cuando se realiza diagnóstico molecular de tos ferina utilizando como diana