



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Utilidad del diagnóstico molecular precoz de fiebre Q y rickettsiosis en pacientes con fiebre de duración intermedia



Margarita Bolaños-Rivero<sup>a,1</sup>, Cristina Carranza-Rodríguez<sup>b,c,1</sup>, Michele Hernández-Cabrera<sup>b,c</sup>, Elena Pisos-Álamo<sup>b,c</sup>, Nieves Jaén-Sánchez<sup>b,c</sup> y José-Luis Pérez-Arellano<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología y Parasitología, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España

<sup>b</sup> Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 17 de noviembre de 2015

Aceptado el 23 de febrero de 2016

On-line el 26 de marzo de 2016

#### Palabras clave:

Fiebre de duración intermedia

*Coxiella burnetii*

*Rickettsia* spp.

PCR

### R E S U M E N

La mayor parte de los casos de fiebre de duración intermedia (FDI) en España corresponden a enfermedades infecciosas (principalmente fiebre Q y rickettsiosis). En la práctica clínica el diagnóstico causal de estas entidades se basa en el inmunodiagnóstico, con una escasa utilidad en fases precoces. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la utilidad de técnicas moleculares en el diagnóstico precoz de fiebre Q y rickettsiosis en pacientes con FDI. Se estudió mediante PCR la presencia de material genético de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia* spp. en muestras sanguíneas de 271 pacientes con FDI. La especificidad de ambas técnicas es elevada, permitiendo el diagnóstico en casos no diagnosticados mediante detección de anticuerpos específicos. Estos datos sugieren que el empleo de técnicas moleculares, con una adecuada selección de la muestra de estudio y el empleo de cebadores adecuados, es un elemento útil en el diagnóstico precoz de las principales causas de FDI, principalmente si la serología es negativa o no es concluyente.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

## Usefulness of the early molecular diagnosis of Q fever and rickettsial diseases in patients with fever of intermediate duration

### A B S T R A C T

Most cases of fever of intermediate duration (FDI) in Spain are associated with infectious diseases (mainly Q fever and rickettsia infections). In clinical practice, the causal diagnosis of these entities is based on immunodiagnostic techniques, which are of little help in the early stages. Therefore, the aim of this study was to evaluate the usefulness of molecular techniques for the early diagnosis of Q fever and rickettsia diseases in patients with FDI. A PCR method was used to detect the presence of genetic material of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in blood specimens from 271 patients with FDI. The specificity of both techniques is high, allowing diagnosis in cases undiagnosed by specific antibodies detection. These data suggest that the use of molecular techniques, with proper selection of the study specimen, and using appropriate primers is a useful tool in the early diagnosis of the main causes of FDI, especially if serology is negative or inconclusive.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

#### Keywords:

Fever of intermediate duration

*Coxiella burnetii*

*Rickettsia* spp.

PCR

### Introducción

Se denomina fiebre de duración intermedia (FDI) a la situación clínica en la que se detecta una temperatura axilar superior a 38 °C, sin foco aparente, con una duración superior a una semana

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlperez@dcmq.ulpgc.es (J.-L. Pérez-Arellano).

<sup>1</sup> Ambas autoras contribuyeron de forma similar en este artículo.

**Tabla 1**  
Resultados de ambas PCR en los grupos de estudio

Grupo Diagnóstico serológico	PCR Cox+	PCR Cox-	PCR Cox total	PCR Rck+	PCR Rck-	PCR Rck total
Fiebre Q	23	63	86	0	15	15
Tifus murino	1	34	35	29	16	45
Infección por CMV	0	16	16	1	4	5
Infección por VEB	0	13	13	1	6	7
Diagnóstico «incompleto»	2	55	57	1	34	35
No diagnóstico	2	62	64	3	32	35
Total	28	243	271	35	107	142

CMV: citomegalovirus; PCR Cox: PCR para *Coxiella burnetii*; PCR Rck: PCR para *Rickettsia*; VEB: virus de Epstein-Barr.

e inferior a 3 semanas, que se presenta en pacientes no inmunodeprimidos, sin ingreso hospitalario previo y en los que tras una evaluación inicial se desconoce su etiología<sup>1</sup>. La mayor parte de los casos corresponden a enfermedades infecciosas (principalmente ocasionadas por *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., *Brucella* spp., citomegalovirus [CMV] y virus de Epstein-Barr [VEB]<sup>2</sup>). En la práctica clínica, el diagnóstico causal de estas entidades se basa en el inmunodiagnóstico, lo que requiere al menos 15-21 días desde el comienzo de la infección hasta que aparecen los anticuerpos. Por ello, las técnicas serológicas son poco útiles en el diagnóstico precoz de estas enfermedades. Sin embargo, la identificación de los principales agentes causales en las fases iniciales tiene gran interés por varias razones: a) frecuentemente son enfermedades con una gran afectación del estado general que se benefician del tratamiento etiológico, si existe; b) en ocasiones se presentan como cuadros clínicos graves o complicados que requieren hospitalización<sup>3</sup>; c) la duración del tratamiento empírico recomendado difiere entre las 2 formas principales encontradas (fiebre Q y tifus murino), y d) en algunos casos de fiebre Q, a pesar del tratamiento antimicrobiano adecuado, persisten las manifestaciones clínicas, lo que indica la necesidad de añadir corticoides<sup>4</sup>.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la utilidad de técnicas moleculares (*polymerase chain reaction* [PCR]) en el diagnóstico precoz de fiebre Q y rickettsiosis en pacientes con FDI.

## Pacientes y métodos

La población total de estudio estaba constituida por 271 pacientes con criterios de FDI<sup>1</sup>, evaluados durante un periodo de 6 años (2004-2009) en las consultas externas de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical (UEIMT). En todos ellos se recogieron de forma protocolizada los datos epidemiológicos, clínicos, estudio analítico elemental en sangre y orina, radiografía de tórax, hemocultivos, y se realizaron pruebas para la detección de anticuerpos frente a *C. burnetii*, *Rickettsia typhi*, CMV y VEB. Se prestó un especial interés en la determinación del intervalo desde el inicio del cuadro clínico y el estudio serológico y el empleo previo de antimicrobianos.

El diagnóstico serológico de la infección por *C. burnetii* o *R. typhi* se realizó por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (*Coxiella burnetii*-Spot IF, *Rickettsia mooseri* Spot IF, BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia). Los criterios empleados para el diagnóstico fueron: a) un título único de IgM  $\geq$  1/80 e IgG  $\geq$  1/320 frente a antígenos de *C. burnetii* en fase II o un título único de IgM  $\geq$  1/40 e IgG  $\geq$  1/160 frente a *R. typhi*; b) seroconversión (desde títulos iniciales negativos a positivos a las 2-3 semanas), o c) un incremento de 4 veces el título de IgG entre el suero de la fase aguda y la fase de convalecencia.

Los pacientes se clasificaron en varios grupos: a) «diagnóstico definido de fiebre Q o de rickettsiosis», que fueron subdivididos atendiendo a si la serología inicial era negativa o positiva; b) «otros diagnósticos definidos» (infección por VEB y CMV, empleando los criterios usuales de diagnóstico); c) «diagnóstico «incompleto»», en los que no pudo establecerse un diagnóstico definido debido a que el

paciente no presentaba criterios iniciales diagnósticos y no acudió para su seguimiento, y d) «no diagnóstico», si tras todos los estudios no se llegó a un diagnóstico definido.

Se recogió de cada paciente una muestra de plasma con EDTA en el momento que acudió a la consulta. Se mantuvieron congeladas y posteriormente se procesaron 200  $\mu$ l para la extracción de ADN (QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini kit, Qiagen, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. El diagnóstico molecular se realizó mediante técnicas de amplificación y detección del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *C. burnetii* y *Rickettsia* spp. utilizando en el primer caso cebadores que amplifican el segmento de inserción IS1111<sup>5</sup> y para *Rickettsia* spp. utilizando como diana el espacio intergénico 23S-5S rRNA<sup>6</sup>.

## Resultados

De los 271 pacientes con FDI se realizó el diagnóstico de fiebre Q en 86 casos (31,7%), de tifus murino en 66 (24,3%), de infección por CMV en 16 (5,9%) y de infección por VEB en 13 (4,3%). En 64 pacientes no se pudo llegar al diagnóstico final, y 57 presentaron un «diagnóstico incompleto». Por ello, la mitad de los pacientes con FDI fueron diagnosticados serológicamente de fiebre Q o tifus murino.

Se estudió mediante PCR la presencia de material genético de *C. burnetii* en 271 pacientes con diferentes diagnósticos serológicos (tabla 1). Existía una asociación significativa de un punto de vista estadístico entre la positividad de la prueba (detección molecular mediante PCR de *C. burnetii*) y el diagnóstico serológico de fiebre Q (test de Fisher,  $p < 0,05$ ). Las características de la prueba fueron las siguientes: a) sensibilidad: 26,7% (IC95%: 18,5-36,9%); b) especificidad: 97,9% (IC95%: 95,8-99,8%); c) valor predictivo positivo: 82,1% (IC95%: 64,4-92,2%), y d) valor predictivo negativo: 74,1% (IC95%: 68,2-79,2%).

Con el objetivo de identificar la utilidad de la detección molecular mediante PCR de *C. burnetii* en pacientes con fiebre Q, reevaluamos los resultados atendiendo a los resultados de la serología. Los datos se expresan en la tabla 2a. Empleando el test de Fisher, se observó que existía una asociación significativa ( $p < 0,001$ ) entre la presencia de una serología inicial positiva y una PCR de *C. burnetii* negativa.

Este hecho se relaciona con el tiempo de evolución de la enfermedad, que era significativamente menor en los pacientes con PCR positiva (7 días [5-12]) con respecto a los que la PCR era negativa

**Tabla 2a**  
Relación entre los datos serológicos y los resultados de la PCR

	Serología inicial negativa	Serología inicial positiva	Total
PCR Cox+	20	1	21
PCR Cox-	20	43	63
Total	40	44	84 <sup>a</sup>

PCR Cox: PCR para *Coxiella burnetii*.

<sup>a</sup> En 2 pacientes con resultado de PCR Cox+ no se pudo realizar la serología inicial frente a *Coxiella burnetii*.

**Tabla 2b**

Relación entre los datos serológicos y los resultados de la PCR

	Serología inicial negativa	Serología inicial positiva	Total
PCR Rck+	12	17	29
PCR Rck–	6	10	16
Total	18	27	45

PCR Rck: PCR para *Rickettsia*.

(14 días [4-90]). Por otro lado, un 56% de los pacientes con fiebre Q en los que la PCR de *C. burnetii* fue negativa habían recibido algún tratamiento antimicrobiano (doxiciclina en 2 casos, quinolonas en 6 casos y betalactámicos en 27 casos).

El estudio mediante PCR para detectar genoma de *Rickettsia* spp. se realizó en 142 pacientes con diferentes diagnósticos serológicos (tabla 1). Existía una asociación significativa desde un punto de vista estadístico entre la positividad de la prueba (detección molecular mediante PCR de *Rickettsia* spp.) y el diagnóstico de tifus murino (test de Fisher,  $p < 0,0001$ ). Las características de la prueba fueron las siguientes: a) sensibilidad: 82,9% (IC 95%: 67,3-91,9%); b) especificidad: 85,0% (IC 95%: 77,1-90,6%); c) valor predictivo positivo: 64,4% (IC 95%: 49,8-76,8%), y d) valor predictivo negativo: 93,8% (IC 95%: 82,7-97,1%).

Con el objetivo de identificar la utilidad de la detección molecular mediante PCR de *Rickettsia* spp. en pacientes con tifus murino, reevaluamos los resultados atendiendo a los resultados de la serología. Los datos se expresan en la tabla 2b. No existía asociación entre la presencia de serología negativa frente a *R. typhi* y una PCR positiva genérica para *Rickettsia* spp. (test de  $\chi^2$ ,  $p = 0,80$ ). No encontramos diferencias en el tiempo de evolución de la enfermedad según los resultados de la PCR, siendo en ambos casos entre 4 y 15 días.

## Discusión

Existen escasos estudios en humanos acerca de la utilidad de la PCR de *C. burnetii* en muestras sanguíneas para el diagnóstico de la fiebre Q<sup>7-10</sup>. Nuestro estudio presenta similitudes, pero también algunas diferencias con ellos. Así, como hemos comprobado, la rentabilidad de la PCR es mayor cuando se realiza en fases precoces de la enfermedad<sup>7,8</sup>. Los resultados también son diferentes cuando se emplean cebadores que amplifican secuencias diferentes (p. ej., *htp AB* o *ompA*) o técnicas diferentes (PCR clásica, *nested* PCR o PCR a tiempo real)<sup>7-10</sup>. Por otro lado, nuestros resultados son similares a los de otros autores al obtener una mayor rentabilidad diagnóstica cuando se emplean muestras de plasma frente a muestras de suero<sup>9</sup>. De cualquier forma, en nuestro trabajo se observa que esta técnica presenta una elevada especificidad en el diagnóstico de la fiebre Q aguda en las fases precoces de la enfermedad. La negatividad de la prueba en fases precoces puede relacionarse con el elevado empleo de antimicrobianos (incluidos los betalactámicos), lo que refuerza la actitud de evitar su empleo en casos de FDI. En este sentido, tiene interés señalar que *C. burnetii* posee peptidoglicano en su pared celular<sup>11</sup> y es sensible in vitro a ampicilina<sup>12</sup>. Por ello, es posible que los betalactámicos sean eficaces en la eliminación de *C. burnetii* en sangre y por ello capaces de negativizar la PCR. Sin embargo, su dificultad para penetrar en el interior de las células condiciona su ineficacia en la práctica. Por otro lado, la presencia de material genético de *C. burnetii* en pacientes en los que la serología es positiva puede sugerir la posibilidad de desarrollo de una forma crónica<sup>7,8</sup>.

El empleo de la PCR para el diagnóstico precoz de infecciones por el género *Rickettsia* empleando muestras sanguíneas en la literatura es aún menor que para la fiebre Q, y en estos trabajos el

número de pacientes estudiados es muy escaso<sup>13-15</sup>. En general, los datos de la literatura demuestran una baja sensibilidad, aunque también se observan diferencias atendiendo al momento evolutivo de la enfermedad. En nuestro trabajo, el empleo de cebadores genéricos permite detectar no solo *R. typhi* sino también otras rickettsias que pueden estar presentes en nuestro medio (p. ej., *R. felis* o *R. massiliae*)<sup>16,17</sup>, por lo que no sorprende la detección de casos positivos mediante PCR en pacientes con serología negativa frente a *R. typhi*.

El uso combinado de estas 2 PCR nos permitió llegar al diagnóstico en 8 pacientes (4 casos de fiebre Q y 4 rickettsiosis) en los cuales la serología fue negativa.

En resumen, nuestros datos sugieren que el empleo de técnicas moleculares, con una adecuada selección de la muestra de estudio y el empleo de cebadores adecuados, es un elemento útil en el diagnóstico precoz de las principales causas de FDI, principalmente si la serología es negativa o no es concluyente. El empleo de otras técnicas moleculares como LAMP, que no necesita del uso de termociclador y se realiza en 60 min, podría aportar ventajas adicionales<sup>18-20</sup>.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado en parte por el INIA, FAU2006-00002-C04-01.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Rivero A, Zambrana JL, Pachón J. Fiebre de duración intermedia. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 2003;21:145–50.
- Espinosa N, Cañas E, Bernabeu-Wittel M, Martín A, Viciano P, Pachón J. Cambios en el espectro etiológico de la fiebre de duración intermedia. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:416–20.
- Hernández Cabrera M, Ángel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francès A, Martín-Sánchez AM, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:740–3.
- García-Alfranca F, Clemente-Rodríguez C, Pigrau-Serrallach C, Fonollosa-Pla V, Vilardell-Tarres M. Q fever associated with persistent fever: An immunologic disorder? *Clin Infect Dis*. 1994;18:122–3.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 2000;72:285–329.
- Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso MI, Sousa R, García-Pérez AL, et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* spp in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4572–6.
- Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5094–8.
- Ughetto E, Gouriet F, Raoult D, Rolain JM. Three years experience of real-time PCR for the diagnosis of Q fever. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 2: 200–1.
- Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:286–90.
- Jaton K, Peter O, Raoult D, Tissot JD, Greub G. Development of a high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New Microbes New Infect*. 2013;1:6–12.
- Amano K, Williams JC. Sensitivity of *Coxiella burnetii* peptidoglycan to lysozyme hydrolysis and correlation of sacculus rigidity with peptidoglycan-associated proteins. *J Bacteriol*. 1984;160:989–93.
- Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1869–74.
- Giulieri S, Jaton K, Cometta A, Trellu LT, Greub G. Development of a duplex real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64:92–7.
- Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;64: 126–9.
- Znazen A, Sellami H, Elleuch E, Hattab Z, Ben Sassi L, Khrouf F, et al. Comparison of two quantitative real time PCR assays for *Rickettsia* detection in patients from Tunisia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003487.

16. Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Ángel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, et al. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1961–4.
17. Fernández de Mera IG, Zivkovic Z, Bolaños M, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Gutiérrez C, et al. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1869–70.
18. Chen HW, Ching WM. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid and easy detection of *Coxiella burnetii*. *J Microbiol Methods.* 2014;107:176–81.
19. Dittrich S, Castonguay-Vanier J, Moore CE, Thongyoo N, Newton PN, Paris DH. Loop-mediated isothermal amplification for *Rickettsia typhi* (the causal agent of murine typhus): Problems with diagnosis at the limit of detection. *J Clin Microbiol.* 2014;52:832–8.
20. Pan L, Zhang L, Wang G, Liu Q. Rapid, simple, and sensitive detection of the ompB gene of spotted fever group rickettsiae by loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect Dis.* 2012;12:254.