



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

CAMBIOS EN EL ESPECTRO ETIOLÓGICO DE LA FIEBRE DE DURACIÓN INTERMEDIA EN EL SUR DE EUROPA

TESIS DOCTORAL

de

NURIA ISABEL ESPINOSA AGUILERA

09/12/2015

DIRECTORES:

Prof. JERÓNIMO PACHÓN DÍAZ

Dr.D. ELÍAS CAÑAS GARCÍA-OTERO

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

El Prof. Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla y Jefe de Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen del Rocío,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título "*Cambios en el espectro etiológico de la Fiebre de Duración Intermedia en el Sur de Europa*" ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada en Medicina Doña Nuria Isabel Espinosa Aguilera, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Sevilla a 9 de diciembre de 2015.

Fdo.: Jerónimo Pachón Díaz

I. INDICE

I. INTRODUCCIÓN

II. FIEBRE

1. CONCEPTOS

- a. Pirexia y fiebre
- b. Hipertermia
- c. Pautas de fiebre: intermitente, continua.

2. CLASIFICACIÓN SEGÚN HUÉSPEDES Y EPIDEMIOLOGÍA

- a. Fiebre según criterios del huésped: inmunocompetente, enfermedades subyacentes crónicas e inmunodeprimido.
- b. Fiebre según el ambiente epidemiológico: comunidad, hospitalaria, o asociada a la asistencia sanitaria.

3. FIEBRE SEGÚN LA DURACIÓN

- a. Fiebre de corta duración
- b. Fiebre de duración intermedia
- c. Fiebre de origen desconocido
 - Fiebre “clásica”.
 - Fiebre en el paciente inmunocomprometido (o neutropénico).
 - Fiebre en el paciente en la infección por el VIH.
 - Fiebre nosocomial.

4. ETIOLOGÍA DE LA FIEBRE DE LA COMUNIDAD

1. Infecciones sistémicas

a. Bacterianas

- i. Rickettsias
- ii. Fiebre Q
- iii. *Brucella melitensis*
- iv. Fiebre tifoidea
- v. *Bartonella* spp.
- vi. *Ehrlichia* spp.
- vii. Tuberculosis

b. Víricas

- i. Citomegalovirus
- ii. Virus de Epstein-Barr
- iii. Parvovirus B19
- iv. Virus herpes humano 6
- v. Virus de la inmunodeficiencia humana

c. Protozoos

- i. *Toxoplasma gondii*

2. Infecciones localizadas

- a. Abscesos intraabdominales
- b. Infecciones del tracto urinario
- c. Endocarditis infecciosa

3. Colagenosis y vasculitis

- a. Enfermedad de Still del adulto

4. Neoplasias

- a. Tumor de células renales
- b. Linfoma

5. Miscelánea

- a. Tiroiditis

III. PLANTEAMIENTO

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

V. MÉTODOLÓGÍA

1. CENTROS Y PERIODO DE ESTUDIO

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN: DEFINICIONES Y CRITERIOS

2.1. Criterios de inclusión

2.2. Criterios de exclusión

3. PROTOCOLO DE ESTUDIO

3.1.1. VARIABLES ANALIZADAS

- A.** Variables epidemiológicas
- B.** Variables clínicas
- C.** Variables biológicas estándares
- D.** Variables biológicas opcionales
- E.** Variables evolutivas y asistenciales
- F.** Diagnóstico final tras estudios centralizados

3.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CASOS TRAS ESTUDIOS CONVENCIONALES

3.1.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

3.1.4. CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANEXO 1: hoja de recogida de datos

ANEXO 2: Descripción detallada de las técnicas centralizadas de diagnóstico microbiológico utilizadas.

VI. RESULTADOS

1. Población
2. Características demográficas
3. Características epidemiológicas
4. Características clínicas y asistenciales
5. Alteraciones analíticas más frecuentes
6. Aislamientos microbiológicos
7. Otras pruebas complementarias
8. Tratamiento y evolución
9. Diagnóstico inicial tras estudio convencional
10. Realización de estudios centralizados
11. Diagnóstico final tras estudios centralizados
12. Rentabilidad diagnóstica del protocolo
13. Variables asociadas a grupos etiológicos finales

VI. DISCUSIÓN

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

I. FIEBRE

La fiebre es tal vez la expresión clínica más frecuente y sensible de la existencia de enfermedad y uno de los motivos más comunes de demanda de asistencia médica en la población.

En ocasiones, la fiebre es el único dato de enfermedad, angustiante al no ser signo específico de ninguna patología concreta, y es valorada por el médico como la respuesta del organismo ante un hecho patógeno. Incluso con los avances científicos disponibles en la actualidad, la fiebre sin foco constituye un auténtico reto para el clínico así como uno de los problemas diagnósticos más complejos de la Medicina.

1. CONCEPTOS

a. Pirexia y fiebre

Se denomina pirexia a la elevación anormal de la temperatura corporal, y se presenta en dos formas: hipertermia y fiebre.

De las muchas definiciones de fiebre promulgadas a lo largo de los siglos, la propuesta por la International Union of Physiological Sciences Commission for Thermal Physiology en 2001¹ es la que más coincide con los conceptos actuales. Según esta definición, se denomina fiebre a un estado de temperatura central elevada que suele ser, aunque no necesariamente, parte de las respuestas defensivas de los organismos multicelulares (huésped) a la invasión de materia viva (microorganismos) o inanimada, reconocida por el huésped como patógena o externa^{2, 3}.

La respuesta febril (de la que la subida de la temperatura es un componente) constituye una reacción fisiológica compleja de la enfermedad, que no sólo

produce un aumento de la temperatura central mediado por citocinas, sino que también genera reactantes de fase aguda y la activación de numerosos sistemas fisiológicos, endocrinos e inmunológicos^{2,4}.

b. Hipertermia

Al contrario que la fiebre, la hipertermia se refiere al aumento no regulado de la temperatura corporal, en el que no están involucradas directamente las citocinas pirógenas, y frente a la cual los antipiréticos estándar suelen ser ineficaces. Sólo en los casos más extremos, complicados por una endotoxemia derivada del intestino parece que las citocinas desempeñen un papel.

Las tres formas más frecuentes de hipertermia son el golpe de calor con sus variantes, la hipertermia maligna y el síndrome maligno por neurolepticos. El diagnóstico es fundamentalmente clínico, basado en los antecedentes previos, acarreado serias dudas diagnósticas y errores terapéuticos si no se sospecha^{3,4}.

c. Pautas de fiebre

Clásicamente se han descrito cuatro modelos de respuesta febril: intermitente, remitente, mantenida y recurrente. Cada uno de estos modelos de fiebre, se asociaban, antes de la aparición de las técnicas diagnósticas modernas, a diferentes etiologías. La fiebre intermitente se define por temperaturas elevadas con descensos diarios a valores normales, y se ha descrito como característica de infecciones piógenas, particularmente abscesos, tuberculosis miliar y linfomas. En la fiebre remitente se producen descensos diarios de la temperatura pero sin llegar a alcanzar valores normales. Esta es la forma general de infecciones, y no es específica de ninguna en particular. Cuando en cualquiera de estas dos pautas, existe gran amplitud entre el pico febril y la temperatura basal, se habla de fiebre séptica. En la fiebre continua o mantenida no se producen modificaciones de la

temperatura a lo largo del día, y se presenta en la fiebre tifoidea, tifus y en las fiebres de origen central. En la fiebre recurrente existe típicamente un período de uno o más días de temperatura normal entre cortos períodos de fiebre, y es característica del paludismo, fiebre recurrente, fiebre por mordedura de rata, infecciones piógenas localizadas e infecciones del tracto urinario⁵.

A pesar de lo anterior, debemos tener presente que el curso de la temperatura no puede considerarse patognomónico de una enfermedad particular^{3,5}

2. CLASIFICACIÓN SEGÚN HUÉSPEDES Y EPIDEMIOLOGÍA

a. Fiebre según criterios del huésped:

Para que se produzca una enfermedad en términos generales, y particularmente en las de causa infecciosa, se necesita una pérdida del equilibrio entre huésped y medio externo. Toda variación de cualquier parte de esta ecuación va a posibilitar la presencia de la enfermedad. Al referirnos al síndrome febril, vemos como ambos factores tienen gran importancia en la orientación diagnóstica y etiológica. De esta forma, según el estado inmunitario del huésped, hablamos de síndrome febril en paciente inmunocompetente o inmunocomprometido.

Fiebre en el paciente inmunocompetente

Es la fiebre que aparece en personas con mecanismos de defensa específicos íntegros. Pueden clasificarse por multitud de parámetros, además de los que posteriormente nombraremos, como por edad, patologías de base, áreas geográficas, nivel socio-económico, etc. Sus causas serán infecciosas, neoplásicas y colagenóticas, citando los grupos etiológicos principales⁶.

Enfermedades subyacentes crónicas e inmunodeprimido

Los mecanismos de defensa del organismo frente a infecciones se dividen en específicos e inespecíficos⁷. Los mecanismos inespecíficos, nos protegen de forma fija, sin necesidad de contactos previos con el agente externo, poniéndose en marcha inmediatamente tras una agresión. En este grupo se incluyen factores hísticos (piel, mucosas, secreciones y factores quimio-enzimáticos) factores celulares (neutrófilos, monocitos y macrófagos), aunque estas últimas células tienen tanta relación con los sistemas específicos que se les llega a considerar células del sistema inmunitario⁸, y por último factores humorales (sistema del complemento). Los mecanismos de defensa específica reconocen y eliminan agentes extraños al organismo, ya sean externos como agentes infecciosos o internos, como tumores o autoagresiones, por medio de la llamada respuesta inmune, que consta de las funciones de adaptación, especificidad y capacidad de memoria. Sus componentes funcionales son los linfocitos B y T, incluyendo el monocito – macrófago por sus relaciones con los anteriores^{9, 10}.

Se considera paciente inmunocomprometido al que presenta alteraciones de uno, o de ambos mecanismos de defensa, ya sea de una forma primaria (congénita) o secundaria (adquirida). Estas alteraciones inmunitarias van a condicionar un aumento en la incidencia de infecciones. La infección por el VIH y la epidemia mundial de SIDA junto al avance que han supuesto los nuevos fármacos inmunomoduladores y los regímenes quimioterápicos para el tratamiento de enfermedades reumáticas o autoinmunes y neoplasias respectivamente, han permitido que los casos de origen adquirido sean predominantes y estén en relación directa con la enfermedad de base o con su tratamiento¹¹⁻¹³.

La fiebre en estos pacientes suele deberse a infecciones, pero también al mismo proceso de base, tratamientos e intervenciones que se les realizan. Las etiologías

de las infecciones van a estar condicionadas por la lesión inmunológica específica alterada (humoral, celular o ambas), por la gravedad de la inmunosupresión y el grado de neutropenia ¹⁴. La importancia de la presencia de fiebre en estos pacientes, está motivada por la alta mortalidad que conllevan las infecciones. Característicamente están causadas por patógenos poco frecuentes en inmunocompetentes, con una presentación clínica extraña y predominando las formas paucisintomáticas con escasa semiología, pero con alta mortalidad. Por todo ello, el planteamiento diagnóstico-terapéutico difiere radicalmente del empleado en el inmunocompetente. La estratificación del riesgo en estos pacientes, fundamentalmente en los pacientes oncológicos, va a determinar el manejo y el uso de terapias antimicrobianas empíricas ampliamente tratadas en las diferentes guías clínicas disponibles ¹⁴⁻¹⁶

a. Fiebre según el ambiente epidemiológico

El medio epidemiológico donde se inicia la fiebre va a servir para diferenciar los síndromes febriles nosocomiales, que implican diferentes etiologías, factores patogénicos y planteamientos terapéuticos, de los de aparición en la comunidad.

Fiebre de la comunidad

Se considera aquel episodio de fiebre que comienza fuera del ambiente hospitalario, o durante las primeras 48-72 horas de hospitalización. La verdadera frecuencia de fiebre en la comunidad es desconocida, pero es uno de los motivos de consulta más frecuentes en la asistencia de medicina general. La etiología suele ser infecciones víricas que se diagnostican por el contexto clínico-epidemiológico, y generalmente se autolimitan.

Esta patología va a estar muy condicionada por el ambiente epidemiológico donde se estudie, predominando siempre las infecciones de la zona geográfica sobre otras causas de fiebre¹⁷.

La fiebre, con o sin datos clínicos acompañantes, era motivo habitual de ingreso hospitalario. En la serie de Mc Gowan de 1987 el 44% de los episodios febriles en pacientes hospitalizados se debían a infecciones de origen en la comunidad, siendo las infecciones pleuropulmonares y urinarias el origen más frecuente. En la actualidad, la mejora de los recursos socio-sanitarios ha permitido que la mayor parte de los episodios febriles sin criterios de gravedad se manejen de forma ambulatoria^{18, 19}.

Fiebre de origen nosocomial o asociada a la asistencia sanitaria

Se emplea este término para definir episodios de temperatura superior a 38°C que acontece tras tres días de ingreso hospitalario y que no existían al ingreso. La fiebre adquirida en pacientes no ingresados pero que padecen enfermedades crónicas que requieren contacto estrecho con el medio sanitario, como los pacientes en hemodiálisis o pacientes oncológicos que reciben tratamiento con quimioterapia, se define como fiebre asociada a la asistencia sanitaria²⁰. Hasta el desarrollo de los estudios epidemiológicos sobre el control de infección hospitalaria no se había profundizado en este problema.

Los estudios de prevalencia de infección hospitalaria demuestran que la fiebre es un dato frecuente durante la hospitalización, presentándose entre un 12,5% al 29% de los ingresos según las series²⁰⁻²³

La fiebre nosocomial no significa la existencia de infección nosocomial, siendo la consecuencia en muchas ocasiones de una amplia variedad de factores relacionados con la hospitalización. En un estudio prospectivo realizado del año

2000 al 2003 por G. Eroles *et al.* en España , se recogieron 204 pacientes con fiebre hospitalaria de los cuales presentaron infección nosocomial el 75,9% siendo las infecciones pulmonares y del tracto urinario las más frecuentes, en 35 pacientes (17%) la causa fue no infecciosa (la más frecuente la flebitis post-punción y los tumores) y en 54 pacientes no se identificó la causa (26,5%)²¹

El resto de series publicadas calculan que las infecciones nosocomiales afectan del 5,7% al 10% de los ingresos, provocando aumento de la morbilidad y la mortalidad, elevación del gasto sanitario y prolongación de la hospitalización ²²⁻²⁴. Entre los factores condicionantes de fiebre durante la hospitalización es importante destacar las intervenciones quirúrgicas, canalización de vías venosas centrales y otras maniobras diagnóstico-terapéuticas que pueden provocar fiebre incluso después del alta²³

3. FIEBRE SEGÚN LA DURACIÓN

La aproximación clínica más extendida a los síndromes febriles sin focalidad adquiridos en la comunidad es la basada en la cronología-duración de la fiebre como síntoma cardinal. No obstante, la actitud diagnóstica y terapéutica de los síndromes febriles no debe orientarse exclusivamente en virtud de la cronología de la fiebre, la valoración de criterios de gravedad y signos de alarma son imprescindibles para decidir el estudio ambulatorio u hospitalario del paciente con fiebre²⁵.

- a. Fiebre de corta duración (FCD): la definimos como episodio de fiebre superior a 38°C, con una duración inferior a 7 días, cuando el paciente no presenta inmunosupresión subyacente y/o estancia hospitalaria reciente. El límite de una semana es arbitrario, intentando como hizo Petersdorf mantener una actitud economicista con los métodos diagnósticos, ya que es uno de los motivos de

consulta más frecuente en Atención Primaria y suele obedecer a viriasis que se autolimitan en la mayoría de los casos^{26, 27}. El comienzo agudo; la temperatura superior a 39°C, con o sin escalofríos, los síntomas respiratorios y la afectación del estado general con astenia, dolores osteomusculares, fotofobia, cefalea, náuseas, vómitos, diarrea, esplenomegalia y adenopatías, entre otros hallazgos sugieren la existencia de una infección como causa de la fiebre²⁸.

- b. Fiebre de duración intermedia (FDI): Se define como la fiebre sin focalidad, adquirida en la comunidad, con duración entre 7 y 28 días, en los que no se llega a un diagnóstico etiológico tras una correcta anamnesis, exploración física y realización de hemograma, elemental de orina, creatininemia y radiografía de tórax, pruebas todas ellas disponibles en un Servicio de Urgencias hospitalario. Excluyendo a los pacientes hospitalizados e inmunodeprimidos (incluyendo la infección por el VIH). Este grupo, se ha definido como entidad nosológica independiente recientemente^{28, 29}.

La FDI entendida como la hemos definido tiene también unas características clínicas y etiológicas bien definidas y diferenciadas claramente de la FCD y de la fiebre de origen desconocido (FOD). De hecho, en el estudio más amplio disponible hasta la actualidad se evaluó prospectivamente entre 1983-1989 la etiología de 505 pacientes con FDI de un área de Sevilla, encontrando que la causa fue una infección sistémica en el 69,5% de los casos (rickettsiosis 37%, siendo la fiebre Q la más frecuente [21%], seguida del tifus murino [8.5%] y la fiebre botonosa [7.5%]); brucelosis 19%; mononucleosis infecciosa 5,9%, infección aguda por citomegalovirus 2,7%, fiebre tifoidea 2%, leptospirosis 1,2% y toxoplasmosis aguda 0,4%), una infección localizada en el 7,7% (infección urinaria 4,9%, absceso intraabdominal 1,1%, sinusitis 1% y endocarditis infecciosas 0,7%)

y otras causas en el 4,1% (enfermedades del colágeno y neoplasias principalmente); en el 18.7% de los casos la fiebre se autolimitó y no se llegó a ningún diagnóstico etiológico³⁰. En base a estos datos se han protocolizado las características asistenciales que han de regir la atención a estos pacientes tanto desde la perspectiva del nivel asistencial (diferenciándose claramente los criterios de ingreso hospitalarios), la estrategia diagnóstica (batería analítica, bacteriología, y serológica, así como estudios de imagen), y el tratamiento empírico (recomendándose, tras una evaluación individualizada, el uso de doxiciclina en pacientes estables no ingresados, y la combinación de doxiciclina-ceftriaxona en pacientes hospitalizados)²⁹. En un ulterior estudio prospectivo realizado en el mismo centro entre 2004-2005 se ha evaluado nuevamente la etiología de la FDI en 179 pacientes, llegándose al diagnóstico etiológico en 109 casos (61%); en el resto de los pacientes (70, un 39%) el cuadro se autolimitó espontáneamente (17 pacientes, 9%), ó bien con tratamiento antimicrobiano empírico (53 pacientes, 30%), principalmente doxiciclina (46, 26%), sin llegar a un diagnóstico etiológico. En aquellos pacientes en los que se realizó un diagnóstico etiológico, 74 (41%) fueron infecciones sistémicas (21 pacientes con fiebre Q aguda, 12 por citomegalovirus, 10 por virus de Epstein-Barr, 8 por primoinfección por VIH, 6 tifus murinos, 6 brucelosis agudas, 5 fiebres botonosas mediterráneas, 2 toxoplasmosis agudas, 2 sífilis secundarias, 1 infección aguda por parvovirus B19 y una bacteriemia primaria por *Escherichia coli*); 18 (10%) a infecciones localizadas (10 infecciones urinarias, 4 abscesos intrabdominales y 4 infecciones ORL), y 17 (9%) a procesos no infecciosos (7 colagenosis/vasculitis; 6 tiroiditis subagudas, 2 enfermedades inflamatorias intestinales, 1 neoplasia gástrica con metástasis hepáticas y 1 eritema anular centrífugo)³¹.

c. Fiebre de origen desconocido (FOD): la primera definición formal de FOD que se aceptó de forma extensiva fue la de Petersdorf y Beeson hace más de cuatro décadas: “fiebre superior a 38,3°C que se produce en varias ocasiones, persiste sin diagnóstico durante más de tres semanas a pesar de un ingreso hospitalario de una semana con fines diagnósticos”³². Más tarde, los investigadores han modificado y extendido esta definición clásica para reflejar los cambios de la evolución de la práctica clínica^{26, 33}. Estos cambios han incorporado la posibilidad del estudio ambulatorio de estos pacientes, ampliando la definición de FOD a aquellos pacientes ambulatorios que habían realizado la menos tres visitas ambulatorias, también se consideró la situación especial de los pacientes inmunosuprimidos (en especial con neutropenia) y la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De esta, según la definición modificada de Durack DT, se conocen las siguientes subclases

- **FOD “clásica”**: Se refiere al tipo de FOD definida por Petersdorf y Beeson en 1961, añadiendo la incorporación del marco de los pacientes ambulatorios, que por otro lado es el manejo de elección en estos pacientes para su evaluación y tratamiento, puesto que en la mayoría de los casos presentan síntomas subagudos o crónicos y por tanto pueden tratarse de forma segura en régimen ambulatorio.

De las muchas revisiones y publicaciones sobre la etiología de la FOD, la mayoría se refieren a la FOD clásica. De la gran cantidad de afecciones que causan FOD clásica la mayoría pertenece a alguno de los cinco grupos principales: infecciones, neoplasias, enfermedades del tejido conjuntivo, otras alteraciones diversas y enfermedades no diagnosticadas. La diferente proporción de estos cinco grupos entre los distintos subtipos de FOD varía discretamente^{26, 33-35}.

- **FOD en el paciente inmunocomprometido (o neutropénico)**. Es la que se da en pacientes que padecen alguna alteración de los mecanismos de inmunidad,

que por tanto le harán más susceptibles de contraer infecciones, a menudo con sintomatología atípica y con escasa expresividad en las pruebas complementarias, con las consecuentes dificultades para el diagnóstico. En este grupo se observa un aumento relativo de infecciones por otros microorganismos a parte de las infecciones bacterianas pirogénicas. La FOD del paciente neutropénico es la que tiene lugar en pacientes con cifras de neutrófilos por debajo de 500²⁶

- **FOD en el paciente con infección por el VIH:** En muchas ocasiones la primoinfección por el VIH puede cursar con fiebre como síntoma cardinal de un síndrome inespecífico que puede durar más de tres semanas, cumpliendo criterios de FOD. En pacientes con infección avanzada la FOD suele deber a causas infecciosas, siendo la más frecuente la tuberculosis, siendo menos frecuentes que en la FOD clásica las enfermedades del colágeno³⁶

- **FOD nosocomial:** Es aquella asociada a los hospitales, que se da en pacientes que llevan al menos 3 días ingresados. En el espectro etiológico, como cabe esperar se contemplan todas aquellas causas de fiebre derivadas de la atención sanitaria, incluidas las intervenciones quirúrgicas, manipulaciones del tracto urinario y respiratorio, dispositivos intravasculares, tratamiento farmacológico e inmovilización^{18, 37}

4. ETIOLOGÍA DE LA FIEBRE DE LA COMUNIDAD

1. Infecciones sistémicas

Son la causa más frecuente de fiebre sin foco hasta el momento, como ya se ha comentado previamente. Tienen la particularidad de manifestarse como síndromes febriles inespecíficos, prácticamente en todos los casos se trata de microorganismos intracelulares, que son fagocitados por el sistema monocito-macrófago, que necesitan la activación de los linfocitos T específicos para su destrucción (inmunidad mediada por células). La activación de los macrófagos y linfocitos T, con la consecuente producción de citocinas va a desencadenar una semiología clínica parecida, centrada principalmente en la presencia de fiebre elevada con signos de hiperreactividad del sistema retículo-endotelial (hepatomegalia, esplenomegalia, aumento de adenopatías, etc.)⁸

a. **Bacterianas**

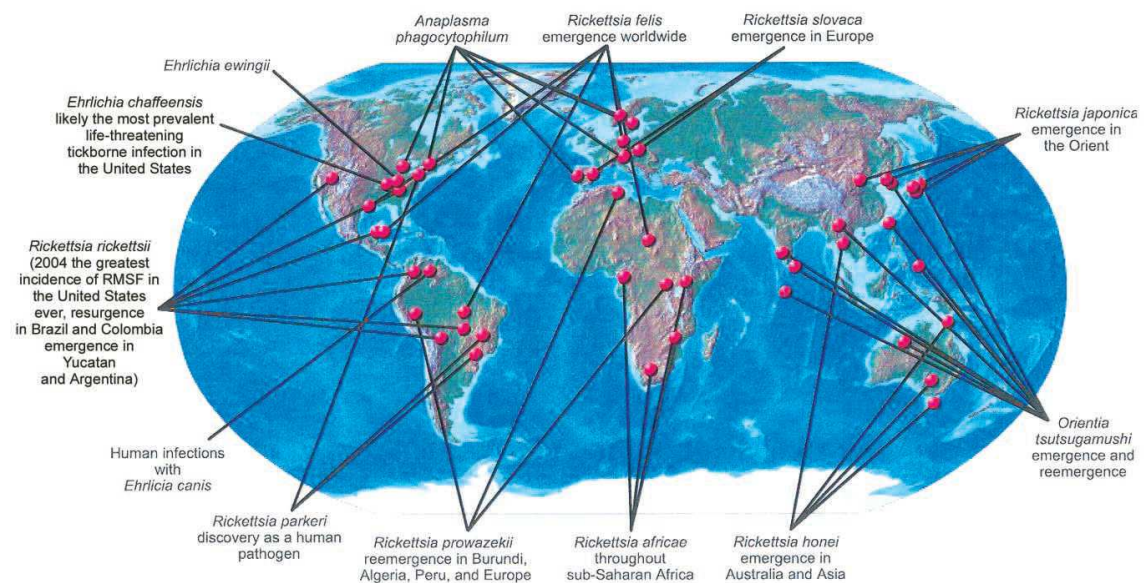
- i. Rickettsias: El género *rickettsia* lo constituyen diferentes especies de bacterias gramnegativas y se enmarca dentro de la familia *Rickettsiaceae* (que además incluye a *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Bartonella*). Todas las especies del género tienen en común la necesidad de ser parásitos intracelulares, su corta viabilidad fuera de los reservorios y vectores que infectan y la dificultad para ser cultivadas en laboratorio. Su ciclo vital salvaje se mantiene a través de infectar distintas especies de hospedadores (en general mamíferos) y vectores (en general, garrapatas y pulgas). A excepción de *R. prowazekii*, el ser humano constituye tan sólo un huésped accidental³⁸.

La patogenia es similar en todas las especies, consiste en una vasculitis de pequeño vaso por invasión directa de las células del endotelio, con el consiguiente infiltrado perivascular. La infección se inicia en la zona de inoculación y posteriormente se

extiende célula a célula y por circulación venosa hasta producir una vasculitis multisistémica, según su distribución las *Rickettsias* pueden provocar neumonitis intersticial, miopericarditis, vasculitis cutánea (clásico exantema), meningitis linfocitaria, así como afectación hepática, renal y gastrointestinal. Son hallazgos frecuentes la elevación de las transaminasas y la trombopenia (por consumo plaquetario), más raramente, por fenómenos de aumento de la permeabilidad capilar, puede provocar edemas e incluso shock. La coagulación intravascular diseminada (CID) y los fenómenos hemorrágicos son igualmente raros.

La clasificación más utilizada es la que divide a las rickettsiosis en dos grandes grupos, el de las fiebres manchadas y el de las fiebres tíficas, dependiendo del área geográfica, de los hospedadores y vectores, diferentes especies de los grupos comentados han distribuido y ocupado nichos ecológicos. En nuestro medio, las especies más frecuentes son la *R. conorii* y la *R. typhi*.^{39, 40}. En la figura se aprecia la diferente distribución de las especies de *Rickettsia* según el área geográfica (Figura1)

Figura 1. Distribución geográfica de *Rickettsia* spp. según área geográfica



Hablaremos en este apartado de los dos principales grupos de *rickettsias* previamente mencionados, dejando a *coxiella burnetii*, *bartonella* y *ehrlichia*, por sus particularidades, apartadas para mencionarlas más adelante.

Rickettsias del grupo de las fiebres tíficas

R. typhi: es el microorganismo causante de la antropozoonosis conocida como tifus murino o tifus endémico. Fue Maxcy quien en 1926 estableció las diferencias entre éste y el tifus epidémico. Posteriormente, en 1931, Dyer *et al* y Zinsser *et al*, aislaron el microorganismo de pulgas de ratas de la vecindad y de cerebros de ratas respectivamente. Su distribución es universal, siendo endémico en extensas áreas geográficas de los cinco continentes. Sin embargo, su importancia clínica y sanitaria se ha subestimado a pesar de constituir en la actualidad, un paradigma de enfermedad infecciosa emergente^{41, 42}. En España, hay evidencias de la existencia de casos de tifus murino en las provincias de Sevilla, Huelva, Murcia y las islas Canarias^{43, 44}.

Es frecuente encontrar anticuerpos específicos frente a esta Rickettsia a nivel mundial, poniendo en evidencia su elevada seroprevalencia, que varía según los autores entre un 3-36%⁴³⁻⁴⁵. En España, se han constatado tasas de seroprevalencia entre el 4-8,7%⁴³. Asimismo su relevancia clínica en nuestro medio se comprobó en los resultados de un estudio prospectivo realizado durante 17 años en Sevilla sobre la etiología de la fiebre de duración intermedia (FDI) adquirida en la comunidad, en el que el tifus murino supuso casi el 17% de los 926 pacientes evaluados³⁰. Se estima que la incidencia del tifus murino como causa de FDI podría ser aún mayor, puesto que en algunos casos se trata de formas de curso leve, tratados en atención primaria, que no precisan asistencia especializada, aunque este extremo se desconoce en la actualidad.

Está demostrado que los reservorios clásicos de *R. typhi* lo constituyen las ratas peridomésticas *Rattus rattus* y *R. norvegicus*, siendo el vector la pulga de la rata

Xenopsylla cheopis. La pulga se infecta al ingerir sangre de ratas infectadas: *R. typhi* se multiplica en sus células intestinales y se excreta por las heces, a partir de donde se infectan nuevas ratas, penetrando a través de pequeñas excoriaciones de la piel. La pulga se infecta al ingerir la sangre de ratas infectadas: *R. typhi* se multiplica en sus células intestinales y se excreta por las heces, a partir de donde se infectan nuevas ratas, penetrando a través de pequeñas excoriaciones de la piel. La pulga infectada también puede transmitir el microorganismo por vía transovárica a toda su descendencia. La transmisión a humanos es accidental por la contaminación del lugar de la picadura o de excoriaciones cutáneas con heces de la pulga. Se ha demostrado que la pulga de gato (*Ctenocephalides felis*) puede desempeñar un papel importante en el ciclo biológico y en la transmisión de *R. typhi* a seres humanos, puesto que en diferentes estudios sobre áreas de tifus endémico se ha detectado una seroprevalencia elevada hacia *R. typhi* en gatos y en otros mamíferos peridomésticos, siendo la pulga con más frecuencia detectada en estos mamíferos *C. felis*, no se detectó *X. cheopis*. Estos hallazgos hacen pensar en la importancia sanitaria y de transmisión del tifus murino a seres humanos de este nuevo ciclo biológico de *R. typhi*: gato/animales peridomésticos-pulga del gato-gato/animales peridomésticos^{42, 45, 46}.

En nuestra área, en el 81% de los casos de tifus murino, no se identificó la fuente de transmisión y, por otro lado, también se han observado elevadas tasas de seroprevalencia de infección por *R. typhi* en muridos y animales domésticos y peridomésticos (perros y gatos)^{30, 41, 46}.

La mayor parte de los casos de tifus murino se producen entre los meses de mayo a octubre, coincidiendo con los períodos de mayor actividad del vector transmisor, sin embargo, tan sólo entre el 3-30% de los pacientes recuerda la picadura de algún insecto en los días previos a la instauración de la enfermedad. La clínica comienza con un cuadro inespecífico tras 7-14 días de período de incubación, siendo los síntomas más frecuentes fiebre, artromialgias, cefalea y exantema. Éste se produce en el 60-

70% de los casos, suele aparecer al quinto día del inicio de los síntomas y durar una media de 4 días; en general es maculopapuloso tenue, afecta al tronco y las extremidades y respeta las palmas y plantas⁴¹. El curso clínico en la mayoría de los casos es benigno con desaparición de la fiebre y restantes síntomas en 10-14 días; la defervescencia con tratamiento específico se produce en 2-4 días. El porcentaje de complicaciones organoespecíficas (neumonitis, hepatitis, meningoencefalitis, insuficiencia renal) no suele superar el 10%, y los casos graves (desarrollo de shock refractario, dificultad respiratoria, fracaso multiorgánico, diátesis hemorrágica por coagulopatía de consumo, o afectación neurológica grave) se producen tan sólo en torno al 2-4%; la mortalidad del tifus murino oscila entre el 0-1%^{38, 41, 45}. Diferentes factores se han asociado a un curso más grave de la enfermedad, entre los que se encuentran la edad, la presencia de diferentes enfermedades hematológicas (hemoglobinopatías), alteraciones analíticas precoces como insuficiencia renal, hipoalbuminemia, hiponatremia e hipopotasemia, el inicio tardío de tratamiento eficaz y el tratamiento con cotrimoxazol⁴⁷.

Las alteraciones de laboratorio más frecuentes son la elevación de las transaminasas hepáticas entre el 70-95% de los casos, como datos de hepatolisis moderada. El daño microvascular (aumento de permeabilidad y fenómenos de coagulopatía de consumo) se refleja en las alteraciones hidroelectrolíticas (hipoalbuminemia, hipopotasemia, hiponatremia e hipocalcemia), y en el discreto/moderado alargamiento de los tiempos de coagulación y la trombopenia que comúnmente se observan en los casos de tifus murino. En torno al 20% de los pacientes desarrollan una leucocitosis (con linfocitosis en la mayoría de los casos), y el otro 20% leucopenia^{42, 47}.

La técnica diagnóstica que se utiliza en la actualidad por su disponibilidad y especificidad es la inmunofluorescencia indirecta (IFI); no obstante, pueden producirse reacciones cruzadas entre especies con similitudes antigénicas⁴⁸. Una cuadruplicación de los títulos de IgG entre los sueros obtenidos en fase aguda y a las 2-4 semanas, o

bien un título único mayor o igual que 1/512 se consideran diagnósticos. Otra técnica indirecta novedosa es el *immunoblot*, que se aplica como ensayo en algunos laboratorios para evitar las reacciones cruzadas, con sueros sometidos a absorciones con antígenos heterólogos³⁹, este método da como resultado un considerable aumento de la especificidad, si bien tiene una baja sensibilidad. La aplicación de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un significativo avance en el diagnóstico de rickettsiosis, permitiendo la detección de rickettsias no sólo en sangre sino también en tejidos afectados. El diagnóstico definitivo de la rickettsiosis requiere su aislamiento en cultivo con medios especializados. 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^{39, 49, 50}.

El tratamiento de elección del tifus murino lo constituyen las tetraciclinas, en concreto la doxiciclina en dosis de 100 mg cada 12 h durante 7-10 días; como alternativas que han mostrado eficacia in vitro, y en series cortas se pueden utilizar quinolonas a las dosis habituales y en el caso de embarazadas, debe valorarse cada caso individualmente pudiendo utilizarse el cloranfenicol. Los macrólidos (sobre todo la josamicina) han resultado activos in vitro a las concentraciones habituales alcanzadas en tejidos para otras infecciones, pero, al contrario que con otras rickettsiosis, no existe aún experiencia clínica clara que apoye su uso para el tifus murino. La profilaxis

se basa en medidas de pre-exposición (campañas de desratización y desinsectación de áreas donde se han producido casos), si bien en nuestro país no es una enfermedad de declaración obligatoria⁴².

R. felis: A pesar de que en la actualidad se considere dentro del grupo de las fiebres manchadas, nos permitimos describirla aquí por sus similitudes ecológicas con *R. typhi* y por producir en seres humanos un cuadro superponible al tifus murino. Fruto de investigaciones durante 5 años, Azad *et al* identificaron esta nueva especie en 1996, en gatos, zarigüeyas y sus pulgas, en áreas de California con elevada incidencia de tifus murino. Inicialmente considerada una *rickettsia* del grupo de las fiebres tíficas por la similitud de sus antígenos de superficie de romp-A, romp-B y LPS, y sus características citopatológicas sobre células Vero con los de *R. typhi*, estudios ulteriores del gen de la citrosintasa y de la proteína de superficie de 16 kDa la han situado más cerca del grupo de las fiebres manchadas. Estudios epidemiológicos, utilizando técnicas de biología molecular, descubrieron que más del 50% de las pulgas de la especie *C. felis* recogidas de diferentes mamíferos, incluyendo gatos y perros, estaban infectadas por *R. felis*⁵¹. Se transmite al ser humano por la picadura de la pulga del gato (*C. felis*) infectada. El papel patogénico en seres humanos se demostró inicialmente identificando *R. felis* mediante técnicas de biología molecular a partir de muestras de sangre de un paciente de Los Ángeles, California, que padeció un cuadro febril agudo catalogado como tifus murino⁵¹. Posteriormente se han descrito nuevos casos aislados en humanos en Europa Occidental y Norteamérica que cursaron clínicamente de forma indistinguible al tifus murino^{52, 53}. Con respecto a nuestro país, en el sur de España se ha identificado *R. felis* en un porcentaje importante de *C. felis* capturadas de perros y gatos de la provincia de Cádiz, y muy recientemente se ha realizado un estudio de seroprevalencia en Sevilla que mostró tasas de infección pasada en población sana del 6,5%^{54,55} (ver Figura 2). Dado lo reciente de su

descripción, aún no se conocen en profundidad su incidencia y características clínicas, pero considerando su epidemiología (reservorio en gatos-perros-mamíferos peridomésticos ampliamente presentes en nuestros hogares) y su vector transmisor (*C. felis* pica con avidez a los humanos), presumiblemente un número que aún desconocemos de casos de FDI y también algunos de los que se diagnostican como tifus murino pueden deberse a *R. felis*

ANDALUSIA (SPAIN)

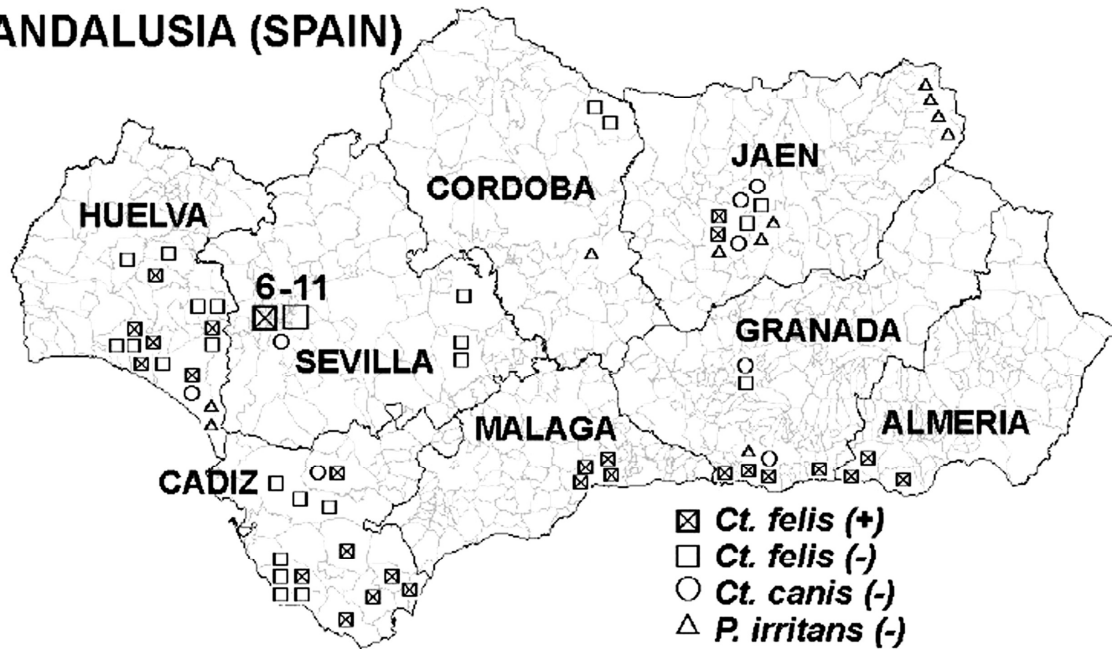


Figura 2. Distribución de pulgas de la familia Pulicidae examinadas para la detección de *R. felis*⁴³

R. prowazekii: microorganismo causante del cuadro conocido como tifus exantemático epidémico. Se relaciona con condiciones socio-sanitarias deprimidas (hacinamiento, hambruna, falta de saneamiento y catástrofes). El único reservorio es el ser humano, a diferencia del resto de especies de *Rickettsia* (con excepción de EEUU donde se ha descubierto que una especie de ardilla voladora puede actuar de reservorio). Se transmite por el piojo corporal (*Pediculus humanus corporis*). Para su transmisión es necesario el contacto estrecho persona-persona. La persona infectada mantendrá de por vida algunas rickettsias, que pueden replicarse posteriormente en

situaciones de inmunodepresión desencadenando un cuadro similar al tifus exantemático, de curso más benigno denominado enfermedad de Brill-Zinsser, considerándose estas personas como posibles reservorios para ulteriores situaciones y entornos que favorezcan la aparición de nuevos brotes. El cuadro clínico se caracteriza por un período de incubación de una semana con fiebre elevada mantenida, postración, artromialgias y cefalea. El exantema aparece en torno al quinto día en axilas y tronco para extenderse a extremidades posteriormente, es maculopapular confluyente (raramente purpúrico) y respeta palmas y plantas. Con tratamiento específico la defervescencia no supera las 48 horas. El diagnóstico se realiza mediante técnicas indirectas, la IFI es la más utilizada, aunque al igual que para el resto de especies, las técnicas moleculares y de cultivo rápido, podrían suponer en el futuro una alternativa a estas técnicas.

El tratamiento de elección es la doxiciclina (100mg/12h) o la tetraciclina (25 mg/Kg/día dividido en cuatro dosis), que debe mantenerse hasta tres días después de haber desaparecido los síntomas. También se encuentra disponible una vacuna con rickettsias inactivadas que está indicada sólo en grupos de especial riesgo. En nuestro país es una enfermedad de declaración obligatoria⁴².

Rickettsias del grupo de las fiebres manchadas

R. conorii : agente causal de la fiebre botonosa, la rickettsiosis exantemática más frecuente en los países de la cuenca mediterránea, donde la enfermedad es endémica. En la década de 1970 y buena parte de la de 1980 se apreció un resurgimiento de la enfermedad en estos países (España, Francia, Italia, Israel). Esta tendencia al aumento del número de casos se ha detenido, e incluso invertido, en los últimos años. El agente causal es *R. conorii*. Puede parasitar diversos ácaros, que

actúan como vectores. En la cuenca mediterránea, el vector principal de la enfermedad es la garrapata del perro (*R. sanguineus*), aunque en otras zonas geográficas puedan transmitirla otras garrapatas ixódidas. Se estima que hasta el 20% de las garrapatas están infectadas por *R. conorii*, si bien no experimentan daño alguno. Las garrapatas también actúan como reservorio de la enfermedad debido a su capacidad de transmitir las rickettsias por vía transovárica y transestadial. Los huéspedes habituales son pequeños mamíferos roedores y perros. El hombre es un huésped accidental en el ciclo biológico de las garrapatas. La mayoría de los pacientes refieren contacto con perros. En ocasiones la enfermedad aparece por picadura de garrapatas que se hallan en el suelo. Con alguna excepción, los estudios de seroprevalencia realizados en población humana sana en zonas endémicas muestran una positividad del 8-26%⁵⁷. La fiebre botonosa aparece fundamentalmente en la época estival, con una incidencia máxima en el mes de agosto, coincidiendo con el ciclo biológico de la garrapata que infesta al perro desde el inicio del verano. La enfermedad afecta a ambos sexos, con un ligero predominio en los varones, y a todas las edades, con predilección por las dos primeras décadas de la vida. Aunque se consideraba clásicamente como una enfermedad rural, cada vez es más frecuente en las zonas urbanas. El período de incubación suele ser de 4-20 días. En la mayoría de los casos no puede determinarse con exactitud, ya que en general la picadura de la garrapata pasa inadvertida. La lesión de inoculación es indolora y rara vez pruriginosa. Está presente en el 70-85% de los casos y puede ser múltiple, aunque no es frecuente. En los niños predomina en la cabeza, y en los adultos, en las extremidades. Consiste en una lesión ulcerosa, recubierta por una escara negra y rodeada de un halo eritematoso. Recibe el nombre de mancha negra o *tache noire*. Las manifestaciones clínicas se instauran de forma abrupta, con fiebre alta, con escalofríos o sin ellos, cefalea, torpor mental, fotofobia, intensa afectación del estado general, mialgias y artralgias, sobre todo en las extremidades inferiores. A partir del tercer o cuarto día

aparece, en casi todos los casos, un exantema generalizado, maculopapuloso, que afecta a palmas y plantas, y que constituye una de las manifestaciones más características de la enfermedad. En ocasiones puede ser purpúrico. En los niños la sintomatología suele ser menos intensa que en los adultos. Aproximadamente un tercio de los pacientes tiene manifestaciones digestivas (vómitos, diarrea o dolor abdominal). A pesar de que el hígado es palpable en el 25 45% de los casos, el curso de la afección hepática es subclínico. La afección muscular en esta entidad es más frecuente de lo que se consideraba, incluso en las formas benignas de la enfermedad . De forma excepcional, se han descrito monoartritis o poliartritis. Suelen afectar las grandes articulaciones y pueden darse en fase aguda o comportarse como una artritis reactiva⁴² .

La velocidad de sedimentación globular (VSG) suele estar moderadamente aumentada. Las alteraciones analíticas más comunes son la leucopenia (en ocasiones, leucocitosis) y la tendencia a la anemia y la plaquetopenia. En el 18-38% de los casos se refiere hipoalbuminemia, que a veces se acompaña de edemas en las piernas, secundarios al aumento de permeabilidad vascular. Puede aparecer hiponatremia. La elevación de las enzimas hepáticas es frecuente (50% de los casos) y constituye la manifestación más común de afectación hepática. Un alto porcentaje de pacientes (35%) presenta una elevación de las enzimas musculares específicas (creatincinasa y aldolasas). En algunos enfermos hay proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario o aumentos moderados de la creatinina sérica, aunque es excepcional la insuficiencia renal aguda. En el curso de la fiebre botonosa se han descrito alteraciones en los factores de la coagulación. También se han referido incrementos de la adenosindesaminasa (ADA) y de la neopterina. El factor de necrosis tumoral (TNF), sus receptores y la interleucina 6 (IL-6) aumentan en la fase aguda de la enfermedad y este aumento es mayor en las formas graves⁴². *R. conorii* requiere, para su cultivo, la inoculación en animales (cobayo) o el empleo de células VERO o

fibroblastos L.929. Por medio de centrifugación (*Shell vial*) se puede detectar *R. conorii* en muestras de sangre, en menos de 72 h⁴⁸. En la actualidad estas técnicas sólo están disponibles en centros de investigación. Con respecto al diagnóstico serológico, parece demostrado que la mejor técnica en cuanto a disponibilidad, sensibilidad, especificidad y rapidez es la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esta técnica permite, además, investigar de forma independiente la presencia de anticuerpos específicos IgM, a fin de distinguir entre infección actual y seropositividad residual. Son títulos significativos a partir de 1/80. A pesar de tratarse de una prueba específica, puede (aunque a títulos bajos) existir positividad cruzada con *R. typhi*, *R. rickettsii* y otras del grupo de las fiebres manchadas^{39, 48}. Dado que los métodos serológicos ofrecen resultados tardíos, los datos clínicos y epidemiológicos siguen constituyendo la base del diagnóstico inicial. Otras técnicas, como el *immunoblot* y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pueden ser de ayuda para una rápida confirmación diagnóstica. La tinción directa de muestras de tejido infectado, incluyendo la lesión de inoculación, por el método de Giménez, pone de manifiesto las rickettsias, pero no las diferencia de otros microorganismos. Por PCR, inmunofluorescencia directa (IFD) o cultivo es posible identificar de forma específica *R. conorii* 17^{48, 58}. En la fase inicial, sólo los antecedentes epidemiológicos, su aparición estival y el hallazgo de la mancha negra pueden orientar el diagnóstico. Una vez que aparece el exantema, la fiebre botonosa debe diferenciarse del sarampión, la meningococemia, la sífilis secundaria, la vasculitis leucocitoclástica y las toxicodermias. Si no existe mancha negra, deben considerarse otras rickettsiosis exantemáticas, especialmente el tifus murino. En estos últimos años hay que añadir en el diagnóstico diferencial algunos casos de primoinfección por el VIH que cursan con fiebre y exantema. Si bien se trata, por lo general, de una enfermedad benigna, que cura sin secuelas, existen con cierta frecuencia (7,5%) formas graves. Se han descrito casos letales hasta en el 2,5% de los pacientes, aunque en general la mortalidad es muy baja o nula. La gran mayoría de los casos

mortales no recibieron tratamiento antibiótico adecuado o éste fue iniciado muy tardíamente (más de 7 días desde el inicio de la fiebre). La sensibilidad in vitro de *R. conorii* a las tetraciclinas y en particular a la doxiciclina (concentración inhibitoria mínima [CIM] 0,25 y 0,06 g/ml, respectivamente) es elevada, al igual que al cloranfenicol (CIM, 0,25 g/ml) y rifampicina (CIM, 0,25 g/ml). Las quinolonas, en especial ciprofloxacino, ofloxacino y pefloxacino (CIM < 1 g/ml), con notable penetración intracelular, son también efectivas. Los macrólidos muestran in vitro una sensibilidad heterogénea. Así, mientras que la eritromicina con CIM de 3-8 g/ml debe considerarse ineficaz, la josamicina y la claritromicina (CIM, 1 g/ml) pueden ser una alternativa. El tratamiento actual de la fiebre botonosa se basa en pautas cortas de doxiciclina, con las que son prácticamente nulos los posibles efectos adversos en los niños menores de 8 años, ya que estos efectos se relacionan, sobre todo, con la dosis total administrada durante la infancia. Estudios realizados con pautas cortas de doxiciclina oral en un solo día (200 mg/12 h en adultos y 5 mg/kg/12 h en niños) han mostrado igual efectividad que las pautas clásicas de clorhidrato de tetraciclina (500 mg/6 h y 30-40 mg/ kg/día en niños durante 15 días). En caso de intolerancia digestiva puede administrarse por vía intravenosa. La josamicina (1 g/8 h en adultos y 50 mg/kg/12 h en niños, durante 5 días) y la claritromicina (500 mg/12 h en adultos y 15 mg/kg/12 h en niños, durante 5 días) también han demostrado ser una buena alternativa en alérgicos a las tetraciclinas y en embarazadas. El ciprofloxacino (500 mg/12 h, 5 días) y el ofloxacino (200 mg/12 h durante 7-10 días) han demostrado también ser eficaces en los adultos y bien tolerados, aunque no superiores a la doxiciclina 21. Su posible toxicidad en el embarazo y en los niños limita su uso. Las medidas de profilaxis consisten fundamentalmente en desparasitar los animales (en particular los perros) mediante el uso de repelentes, evitar el contacto con garrapatas y animales parasitados por éstas y desinfectar los lugares frecuentados por animales

infestados. No hay evidencia de la utilidad de la quimioprofilaxis tras la picadura de una garrapata ⁴².

II. Fiebre Q: La fiebre Q es una zoonosis de distribución universal que afecta a diversas especies animales, especialmente rumiantes, y de modo accidental al hombre. Fue descrita por Derrick en 1937 y, ese mismo año, Burnet, Davis y Cox identificaron el microorganismo como una rickettsia a partir de tejidos de cobayas inoculados experimentalmente y la denominaron *Coxiella burnetii* ⁽⁵⁹⁾. La infección suele ser asintomática, aunque se describen formas sintomáticas muy polimórficas e inespecíficas de carácter agudo. La sospecha y la orientación clínica correctas, la necesidad de estudios complementarios de las funciones cardíaca y hepática, así como el correcto diagnóstico microbiológico constituyen un reto para el manejo adecuado de estos pacientes. *C. burnetii* es un bacilo gramnegativo de pequeño tamaño (0,3-1 µm) que crece exclusivamente en las células eucariotas. Se le clasificó como miembro de la familia *Rickettsiaceae*, pero estudios recientes han demostrado que pertenece al grupo gamma de proteobacterias. *C. burnetii* puede crecer sólo en células vivas, incluyendo cultivos celulares (sobretudo fibroblastos humanos). Cuando se aísla en animales y humanos, infectados de forma natural o en el laboratorio, *C. burnetii* está en fase I, que es la forma altamente infecciosa. En subcultivos se produce un cambio a fase II, que no es infecciosa. Esta expresión antigénica diferente se emplea para distinguir serológicamente los estados agudo y crónico de la enfermedad. *C. burnetii* es una zoonosis ubicua transmisible al ser humano, que se ha identificado en artrópodos, peces, pájaros, roedores, marsupiales y diferentes tipos de ganado. En todo el mundo, los reservorios animales más frecuentes son las vacas, ovejas y cabras. Otros animales domésticos como los caballos, cerdos, camellos, conejos, perros y gatos, pueden estar infectados por *C. burnetii*, pudiendo explicar la aparición de epidemias urbanas. Los

mamíferos infectados eliminan el microorganismo resistente a la desecación en la orina, leche, heces y, especialmente a través de los productos relacionados con el parto, ya que en la placenta de los animales infectados se encuentran altas concentraciones de bacterias (> de 10^9 bacterias/g de tejido)⁶⁰ La infección en el hombre ocurre con mayor frecuencia por la inhalación de pseudoesporas, con afectación de células alveolares y diseminación sanguínea; se admiten otras vías de contagio, como la ingestión de productos lácteos crudos contaminados, la exposición profesional y manipulación de animales contaminados, y esporádicamente, la transfusión de sangre infectada o por vía transplacentaria, que produce infecciones congénitas⁶¹. Las garrapatas pueden transmitir este microorganismo a los mamíferos domésticos, pero no se ha documentado la transmisión al hombre por estos artrópodos.

Excepcionalmente, se ha documentado la transmisión interhumana.

La enfermedad presenta una amplia distribución geográfica y una prevalencia heterogénea, registrándose el mayor número de casos en primavera y verano. Es más frecuente en adultos, aunque puede darse en todas las edades. Se han documentado epidemias importantes de fiebre Q en Suiza, Gran Bretaña, Alemania y, más recientemente en Alemania⁶². En España, donde la enfermedad es endémica, encontramos una diversidad similar, ya que en Andalucía se diagnosticó fiebre Q en el 30% de los pacientes ingresados por fiebre de más de 7 días, además la Fiebre Q fue la causa más frecuente de FDI en un estudio realizado en Sevilla entre 1983 y 1989 por Pompeyo V., detectándose en 108 pacientes de un total de 505 pacientes con FDI³⁰, mientras que en el País Vasco, hasta el 60% de los casos de neumonías contraídas en esta comunidad se atribuyeron a una infección por *C. burnetii*⁶¹

La Fiebre Q se manifiesta clínicamente después de un período de incubación de unos 10-17 días como una infección en la mayoría de los casos asintomática (54-60%), aguda (40%) o crónica (1-5%)⁶³. La infección aguda se caracteriza por su

polimorfismo, y presenta manifestaciones clínicas que van a depender de la puerta de entrada del patógeno^{64, 65}. El cuadro más frecuente suele ser el de neumonía, con fiebre elevada (de hasta 40°C) y distrés respiratorio, con un patrón radiológico atípico. Se han descrito otras manifestaciones clínicas en la fase aguda: afectación cardíaca con pericarditis y miocarditis, que puede ser fatal; meningoencefalitis asociada a pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR), síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller- Fisher y otras manifestaciones menos frecuentes como anemia hemolítica, tiroiditis, pancreatitis, neuritis óptica y mononeuritis. Se han descrito casos de oligoartritis por fiebre Q aguda, aunque esta manifestación se considera más propia de cuadros crónicos⁶⁶⁻⁶⁸. En general, las formas agudas siguen un curso benigno con resolución en 10-15 días, y sólo un número limitado de pacientes (2-5%) requiere hospitalización.

En la fiebre Q crónica la manifestación clínica más frecuente es la endocarditis, que se diagnostica, casi exclusivamente, en pacientes con una afectación valvular previa, en pacientes trasplantados y en inmunodeprimidos. Se ha sugerido la persistencia asintomática en estado quiescente de *C. burnetii* y su reactivación en este tipo de pacientes y en embarazadas. La endocarditis cursa con hemocultivos de rutina negativos y la fiebre está ausente o es baja, con remisiones espontáneas. Debe sospecharse endocarditis por fiebre Q cuando existe una afectación valvular cardíaca asociada a un síndrome infeccioso o inflamatorio de origen desconocido con determinaciones analíticas anormales, tanto bioquímicas como serológicas. La fiebre Q crónica, que suele diagnosticarse tras 12-24 meses de enfermedad, debido a que esta entidad tiene rara consideración, constituye un problema grave y que puede ser potencialmente letal⁶⁹.

El diagnóstico microbiológico de fiebre Q no es sencillo, por lo que se necesita una alta sospecha clínica y un perfil epidemiológico compatible para poder hacer una correcta interpretación de los resultados. El diagnóstico directo puede establecerse

mediante cultivo celular directo mediante aislamiento en cultivo celular convencional o en *shell vial* de *C. burnetii* a partir de muestras sanguíneas o de tejidos, que permite además determinar la sensibilidad a antibióticos, o mediante técnicas moleculares de amplificación y detección del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque estas últimas no están ampliamente difundidas^{63, 64, 69}. Puede demostrarse la presencia del organismo mediante diferentes tinciones y su recuperación de cultivos celulares, procesando muestras de válvulas cardíacas tras intervencionismo. En general los cultivos tienen poca sensibilidad. Se han propuesto diferentes técnicas de amplificación para la detección de ADN específico (*Real time- PCR, Light cycler Nested PCR, etc.*) en cultivo celular, biopsia, sangre y suero. La amplificación en tiempo real de la secuencia IS 11 11 tiene una alta sensibilidad incluso en muestra sérica⁶⁹.

Sin embargo el diagnóstico más ampliamente extendido es el indirecto, para el cual disponemos de la reacción de fijación del complemento (FC) y de inmunofluorescencia indirecta (IFI), con la FC suelen ser frecuentes los falsos negativos, sobretodo en formas crónicas. La IFI es considerada el método de referencia por su sencillez, rapidez, sensibilidad y ausencia de interferencia con los sueros anticomplementarios de algunos pacientes. Debe ir precedida de la absorción del factor reumatoide, con lo que se eliminan los posibles falsos positivos en la detección de anticuerpos IgM. Los criterios serológicos no obstante, pueden diferir discretamente según el área geográfica por lo que el incremento en los títulos de anticuerpos IgM e IgG para antígenos de *C. burnetii* en fase II o e fase I, observado en dos muestras séricas diferidas por 1-2 semanas, debe también tomarse en cuenta para el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

El tratamiento de la fiebre Q aguda consiste en administrar doxiciclina, 200 mg al día, durante 15-21 días. En la meningitis se considera eficaz una fluoroquinolona, puesto que éstas penetran la barrera hematoencefálica. En la hepatitis por fiebre Q,

debido a la respuesta inmunológica asociada, en ocasiones se aconseja utilizar prednisona 40 mg al día durante 7 días (3EIMC). La fiebre Q crónica debe tratarse al menos con dos antibióticos; se propone la combinación de doxiciclina y ciprofloxacino (u ofloxacino) de manera prolongada (2-3 años) retirándola únicamente cuando los anticuerpos frente a los antígenos en fase I presentan una tasa inferior a 1/50 en el caso de los IgA o $< 1/200$ en el caso de los Ig G^{63, 64}. La cirugía de sustitución valvular es necesaria en muchos casos de endocarditis, aunque algunos autores, como Ballester han obtenido buenos resultados con doxiciclina y rifampicina durante 3 años, aunque en estos casos no parece útil la serología para determinar el tiempo de tratamiento antibiótico⁶⁹.

III. *Brucella melitensis*: es un bacilo gramnegativo, del género *Brucella*, agente etiológico, entre otras subespecies, de la brucelosis humana. La brucelosis es una zoonosis clásica (antropozoonosis) transmisible ocasionalmente al hombre a partir de animales infectados, los cuales eliminan gran número de bacterias a través de los genitales, la leche y las heces. La brucelosis humana, es una de las enfermedades bacterianas más comunes del planeta. Se llama así en honor de Davis Bruce, médico militar que en 1887 aisló el agente patógeno del bazo de soldados británicos acuartelados en la isla de Malta⁷⁰. La fiebre de Malta es endémica en muchos países mediterráneos y en España, siendo en nuestro país la especie *B. melitensis* la responsable casi en exclusividad de todos los casos. Se transmite por la ingestión de leche o quesos contaminados o por contacto directo con animales infectados o sus productos (manejo de sangre, orina, descargas vaginales, fetos abortados y placentas de animales infectados). Por esto el personal que trabaja en mataderos o granjas, como también los veterinarios, están en riesgo de adquirirla y diseminarla entre el ganado sano cuando no se toman las medidas sanitarias adecuadas.

También el consumo de lácteos no controlados, predominante en el medio rural, pero existente también en el urbano y su entorno, sirve de vía de transmisión. Las tasas correspondientes al registro de declaración obligatoria han mostrado una disminución progresiva en los últimos años, coincidiendo con intensas campañas de vacunación y de intervención sobre la brucelosis animal en muchas regiones españolas. Mientras la tasa máxima se alcanzó en 1984, con 22,33 casos por 100000 habitantes⁷¹, los registros de años sucesivos han ido descendiendo paulatinamente⁷².

El comportamiento clínico de la brucelosis es bien conocido y ha sido objeto de múltiples descripciones. La infección puede afectar a múltiples sistemas o tejidos del organismo. El uso de antibioterapia y el mayor desarrollo sanitario, pueden modificar la presentación clínica referida en las descripciones clásicas y la sintomatología puede diferir según el entorno social en el que se desarrolle. Tiene un claro predominio de varones sobre mujeres (68 y 32%). Clínicamente se manifiesta con diversos cuadros clínicos. Este comportamiento ha conducido a diferenciar dos formas de presentación: la brucelosis aguda y brucelosis localizada o complicada, según se manifieste como forma séptica-febril, o con datos de afectación localizada visceral⁷⁰. Según la serie de 1028 casos de brucelosis recogida en 2009 por Buzgan *et al.* en Turquía, la brucelosis aguda es la manera habitual de presentación en un 61,6 % de los casos⁷³. En nuestro medio, la presencia de fiebre con escalofríos, sudoración y artromialgias, sugiere brucelosis aguda si coincide con antecedentes epidemiológicos. Historia de contacto con ganado transmisor o con sus productos aparece en un 55,2%. Síntomas inespecíficos como sudoración, escalofríos, astenia, malestar general, artralgias, cefalea o anorexia se manifiestan entre un 74,5 un 20% de casos. Los datos exploratorios más frecuentes suelen ser la hepatomegalia (22,7% de los casos), esplenomegalia (16,1%) y artritis (14,5%), las adenopatías sólo aparecen en un 2,4% de los casos. La presencia de rash e incluso eritema

nodoso es excepcional⁷³. Entre los parámetros analíticos más frecuentes destacan la elevación de la PCR (65,9%), anemia (43,9%), leucopenia (15,3%), con linfomonocitosis relativa (26% de los casos) y la trombopenia (11,8%). Existe elevación de las transaminasas hepáticas en el 31,3% de los casos. Variantes extraordinarias de brucelosis, que pueden cursar únicamente como síndrome febril son la endocarditis brucelar, la forma maligna séptico-tóxica, el síndrome hemofagocítico asociado a *Brucella* y el absceso o bruceloma hepático⁷³⁻⁷⁵.

El diagnóstico definitivo de la enfermedad requiere el aislamiento de *Brucella*, el cual suele hacerse en los hemocultivos. El medio bifásico ha sido el estándar reconocido durante años. En términos generales cursan con hemocultivo positivo el 75-80% de las infecciones por *B. melitensis*.⁷⁵

Los nuevos sistemas de hemocultivos automatizados, del tipo Bactec 9200 o similares, se han mostrado extraordinariamente eficaces, siendo probablemente más efectivo que los medios clásicos, pero destacando fundamentalmente la precocidad de la detección, que suele producirse entre los 3 y 5 días. El subcultivo ciego de rutina a los 7 días no es necesario y debe reservarse para aquellos casos con una elevada sospecha de brucelosis, especialmente si ha existido antibioterapia previa. Este sistema también mejora la rentabilidad del cultivo de muestras de líquido articular, abscesos y líquido cefalorraquídeo (LCR), aunque la frecuencia de recuperación en estos casos suele ser alrededor de un 30%⁷⁵.

En los últimos años, el grupo Colmenero *et al.* Ha observado resultados muy prometedores con la utilización de PCR en sangre periférica de pacientes con brucelosis, para el diagnóstico de la fase inicial de la enfermedad y para la identificación de recaídas (sensibilidad del 100% y especificidad 98,5%)⁷⁶. Aunque estos resultados no han podido ser confirmados por otros autores debido principalmente a la interferencia de algunos elementos hemáticos, como principales

condicionantes de la sensibilidad de la prueba. Zerva *et al* obtuvieron buenos resultados al realizar la prueba en muestras de suero (sensibilidad del 94%, especificidad 100%)⁷⁵. Por lo tanto la PCR podría ser de mucha utilidad en el seguimiento evolutivo de los pacientes que presentan un curso clínico complicado⁷⁶. La PCR también se ha mostrado útil en el aislamiento de *Brucella* en muestras clínicas distintas de la sangre donde los cultivos son, con frecuencia, negativos en los medios habituales⁷⁵.

Las pruebas serológicas tienen una gran trascendencia en el diagnóstico de brucelosis. Su principal limitación es la incapacidad para diferenciar entre infección activa y curada, ya que los anticuerpos persisten generalmente durante un periodo prolongado tras la recuperación clínica. Las pruebas clásicas de uso más extendido son la seroaglutinación de Wright y la aglutinación de Rosa de Bengala, que detectan los anticuerpos aglutinantes, y la prueba de Coombs que detecta anticuerpos no aglutinantes. La negatividad de estas tres pruebas excluye el diagnóstico de brucelosis. Una nueva prueba de inmunocaptura-aglutinación denominada Brucellacapt[®] para la detección de anticuerpos totales frente a *Brucella*, parece mejorar la sensibilidad de la prueba de Coombs, con una especificidad similar, probablemente por la realización de la prueba en medio con PH ácido, lo que favorece en gran manera la aglutinación⁷⁵.

Desde hace más de 20 años, se ha utilizado en España el método de enzimoimmunoanálisis (ELISA) para la detección de inmunoglobulinas específicas de tipo IgM, IgG e IgA contra *Brucella* con una extraordinaria sensibilidad y especificidad, así como una buena correlación con las pruebas de seroaglutinación, sin embargo la inexistencia de una estandarización adecuada de los sistemas comerciales provoca en ocasiones resultados confusos según los valores de referencia de cada laboratorio, especialmente en los casos de evolución crónica de

la enfermedad. La persistencia de títulos elevados es especialmente frecuente en aquellos casos que parten de títulos muy elevados y en aquellos que han tenido focalidad de la infección aunque hayan evolucionado satisfactoriamente. Según algunos autores las brucelosis que parten de una respuesta serológica de bajo nivel y especialmente si es de tipo IgG o IgA, con ausencia de IgM, podría corresponder a formas de reactivación o de adquisición reciente, tras una infección previa asintomática o desapercibida; a este respecto hay que recordar que, en algunos pacientes, el tiempo de incubación de la enfermedad puede ser de varios meses. El tratamiento clásico de la brucelosis es la combinación de doxiciclina (200 mg al día) por vía oral durante 6 semanas y la combinación con gentamicina 4mg/Kg en monodosis. La combinación de doxiciclina y rifampicina (15 mg/Kg/día) ambas durante 45 días por vía oral es la alternativa más eficaz, aunque aumenta discretamente la tasa de recaídas⁷⁴

- IV. Fiebre tifoidea: La fiebre entérica o fiebre tifoidea y paratifoideas están causadas por *Salmonella typhi* y, menos frecuentemente, por *S. paratyphi* A, B y C. Son procesos con una elevada prevalencia mundial, en el año 2000 la fiebre tifoidea fue declarada en 21.7 millones de habitantes y causó 217000 muertes en todo el mundo y la fiebre paratifoidea 5.4 millones de casos⁷⁷. Es un problema importante en países en vías de desarrollo, y en las regiones con peores condiciones sociosanitarias. En España, según el estudio publicado por Ruth Gil *et al.*, entre los años 1997 y 2005, ingresaron 1106 pacientes por fiebre tifoidea y paratifoidea. La tasa de hospitalización anual fue de 0.31 casos por 100000 habitantes y la tasa de mortalidad y morbilidad fue de 0.003 por 100000 habitantes y 0.9%, respectivamente. El agua y los alimentos contaminados son la principal fuente de transmisión⁷⁸. En nuestro país sigue siendo la causa del 50% de las diarreas infecciosas, siendo las manifestaciones extraintestinales, menos frecuentes en nuestro país⁷⁹. La fiebre tifoidea en España, es también en parte una enfermedad importada por los viajeros a áreas endémicas,

aunque el uso de vacunas con virus vivos atenuados (vivotif®) en personas que van a viajar a áreas de alto riesgo ha disminuido su incidencia⁸⁰. La fiebre constituye el síntoma más frecuente, presentándose en el 93-100% de los casos, asociándose a cefaleas, escalofríos, síndrome constitucional y artromialgias. Aparece diarrea en el 43-57% de los casos, por lo que en muchas ocasiones el manejo diagnóstico de los pacientes es el de un síndrome febril, sobre todo teniendo en cuenta que el tratamiento antibiótico empírico puede modificar el cuadro clínico clásico de fiebre tifoidea. El diagnóstico definitivo se realiza mediante aislamiento de *Salmonella typhi* en hemocultivos, heces y orina. Cuando esto no es posible, el diagnóstico se realiza mediante aglutinación de Widal, detectando anticuerpos frente al antígeno O, método de baja sensibilidad. El uso extendido de fluoroquinolonas, tratamiento de elección en la fiebre tifoidea, ha contribuido en los últimos años a la selección de cepas resistentes, fundamentalmente en países donde la enfermedad es endémica, como ocurre en algunas regiones de Asia. En estos casos, las cefalosporinas son el tratamiento de elección, aunque también se han descrito cepas resistentes a éstas. La Azitromicina se ha propuesto como una alternativa eficaz en los casos de fiebre tifoidea no complicada⁷⁷

V. *Bartonella* spp.: Las bartonellas son bacterias gramnegativas, aerobias, no móviles que se comportan como intracelulares facultativos y de difícil cultivo. Hasta 1993 sólo había sido implicada en patología humana una especie de *Bartonella*, *B.bacilliformis*, causante de la enfermedad de Carrión. En 1993, el análisis filogenético y la secuenciación del gen 16S del ARNr hicieron recomendable una nueva clasificación incorporando al género *Bartonella* el género *Rochalimaea*. Además, en los últimos años, gracias a las modernas técnicas de biología molecular y de la mejora en las técnicas de cultivo, se han descrito nuevas especies de *Bartonella* y se ha podido implicar a alguna de ellas en patología humana (tabla 1). Las principales especies de *Bartonella* implicadas en nuestro medio en

enfermedades humanas son *B. henselae* y *B. quintana*⁸¹. Ambas especies mantienen similitudes genéticas, pueden ser transmitidas por vectores, usan a los mamíferos como reservorios, infectan a los mismos tipos de células (endoteliales y eritrocitos) y producen cambios proliferativos a nivel vascular en los pacientes inmunodeprimidos. Una de sus diferencias radica en el reservorio. Mientras que *B. quintana* usa sólo al hombre, *B. henselae* utiliza al gato⁸². En España, el grupo del doctor Blanco y Oteo *et al.* en la Rioja ha detectado la presencia de diferentes especies de *Bartonella* (*B. henselae* y *B. clarridgeiae*) en pulgas de gato, llegando a una proporción del 15%⁸³. Con la excepción de *B. bacilliformis* que está circunscrita a ciertas regiones de la cordillera de los Andes, el resto de bartonellas están ampliamente distribuidas por la geografía terrestre. La distribución de *B. bacilliformis* guarda relación con la distribución de su vector, *Lutzomyia verrucarum*. Otros potenciales vectores de bartonellas son las pulgas de los gatos (*Ctenocephalides felis*). En estas pulgas se ha aislado *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* y *B. quintana*. No obstante, y hasta la fecha, el único vector reconocido de *B. quintana* es el piojo corporal (*Pediculus humanus corporis*). En los últimos años también se ha descrito la presencia de *Bartonella* spp. en *Ixodes ricinus*, si bien queda por conocer el papel epidemiológico que tienen las garrapatas en este tipo de infecciones. Respecto a los reservorios, el gato es el reservorio natural de *B. henselae* y *B. clarridgeiae*, y los ratones campestres (p. ej., *Peromyscus leucopus*) de *B. vinsonii*, *B. grahamii*, *B. doshiae* y *B. taylorii*. Hasta la fecha, no existe otro reservorio conocido que el hombre, para *B. quintana* y *B. bacilliformis*. En los mamíferos, cada especie de *Bartonella* está adaptada a su reservorio, pudiendo producir bacteriemias persistentes debido al tropismo de este grupo de bacterias por los hematíes. En estos pueden persistir de forma asintomática largos períodos de tiempo. Esta localización se ha demostrado en hematíes de gatos (*B. henselae*), de alcohólicos y de vagabundos (*B. quintana*)⁸¹

Una misma especie de *Bartonella*, puede causar diferentes manifestaciones clínicas. Hablaremos aquí de las más frecuentes en nuestro medio:

Enfermedad por arañazo de gato: La enfermedad por arañazo de gato se considera la causa más frecuente de linfadenopatía crónica benigna en niños y jóvenes. En el 90% de los casos existe el antecedente de contacto con gatos o perros y en el 60% de los casos existen antecedentes de arañazo y/o mordisco por gatos o perros, con una mayor incidencia en los pacientes que poseen gatos menores de un año. El cuadro clínico ha sido bien estudiado. Tras un período de incubación que varía de 5 a 20 días, en la puerta de entrada o zona de inoculación se observan por lo general pequeñas pápulas eritematosas o pústulas. En la evolución del proceso, del 85 al 100% de los pacientes presentan adenopatías, a veces dolorosas, cercanas a los puntos previos de inoculación (axila, cuello, ingle). En el 80% de los casos se localizan en la parte superior del cuerpo. La afectación oculoganglionar o síndrome de Parinaud (conjuntivitis y linfadenopatía preauricular) es una forma de enfermedad por arañazo de gato que representa hasta el 6% de los casos. El proceso suele ser benigno y en la mayoría de los casos las linfadenopatías se resuelven de modo espontáneo en el curso de varios meses, si bien en el 10% puede producirse una supuración y fistulización. Durante el curso clínico de la enfermedad se ha descrito, entre otras, la presencia de fiebre (31%), mal estado general (30%), anorexia (15%), cefalea (14%), exantema (6%) y artralgias (4%)⁸¹.

Angiomatosis bacilar: *B. henselae* y *B. quintana* son los agentes responsables de este cuadro clínico que se produce fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos, en especial infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con menos de 100/mm linfocitos CD4, aunque también se ha descrito en inmunocompetentes. Se trata de un proceso proliferativo vascular que suele afectar a la piel, si bien puede afectar a otros órganos (médula ósea, bazo, hígado).

Las lesiones cutáneas son inespecíficas, de milímetros a centímetros; únicas o múltiples (hasta 100); de localización cutánea o subcutánea. Pueden consistir en pápulas sobre bases eritematosas, úlceras, nódulos o placas hiperpigmentadas. Son friables, sangran con facilidad y no suelen ser pruriginosas. En su evolución pueden persistir o bien resolverse espontáneamente. Todas las mucosas (oral, anal, conjuntival, gastrointestinal, etc.) pueden verse afectadas. También pueden afectarse los huesos largos, produciendo lesiones óseas líticas extremadamente dolorosas. En el ámbito epidemiológico, los pacientes con angiomatosis bacilar infectados por *B. henselae* son propietarios de gatos, han sido arañados o mordidos por éstos, o sus gatos tenían pulgas. En estos casos se afectan más los ganglios linfáticos y el hígado. Los pacientes infectados por *B. quintana* corresponden a grupos sociales desfavorecidos y refieren el antecedente de haber sido picados por piojos. En este caso, y a diferencia del anterior, la aparición de casos se detecta en brotes. El aspecto externo de las lesiones cutáneas de angiomatosis bacilar es muy difícil de diferenciar del sarcoma de Kaposi, con el que además puede coexistir. Por este motivo toda lesión de aspecto vascular o tumoración cutánea de origen incierto se debe biopsiar para proceder a su examen⁸¹.

Otras enfermedades provocadas por *Bartonella* spp. son la peliosis hepática, la fiebre de las trincheras (*B. quintana*), bacteriemia persistente, endocarditis, enfermedad de Carrión y fiebre de Oroya (forma aguda de la anterior). La *Bartonella* además puede afectar a gran variedad de órganos y tejidos, pudiendo producir infecciones del área otorrinolaringológica, oftalmitis, uveítis, encefalitis, hepatitis, anemia hemolítica, etc. La *Bartonella* spp. también es reconocida como causa de fiebre sin focalidad^{84, 85}. Desde el punto de vista analítico, y con excepción de los rasgos típicos de la enfermedad de base, no existen datos específicos de infección por *Bartonella* spp.

El examen histológico es a menudo útil, aunque no patognomónico. En los pacientes con sospecha de enfermedad por arañazo de gato, el estudio de los ganglios afectados muestra granulomas necrosantes, microabscesos e hiperplasia folicular. Estos granulomas suelen presentar un aspecto de empalizada histiocítico-epitelioide, algunas células gigantes multinucleadas, neutrófilos y restos nucleares centrales. La tinción de Warthin-Starry sólo demuestra la existencia de bacilos en aquellos ganglios que contienen granulomas que supuran (30% de los casos). Existen otras técnicas como las de inmunohistoquímica también capaces de detectar la presencia de *Bartonellas* spp. En los pacientes con angiomatosis bacilar y con verruga peruana, se puede apreciar una neoformación lobular de los capilares junto con la presencia de un infiltrado inflamatorio de predominio de neutrofílico y leucocitoclasia en el intersticio. En la tinción de Warthin-Starry y con el microscopio electrónico se visualiza material granular en el intersticio que evidencia “pelotones celulares” que se corresponderían con las *Bartonellas* spp. Como ya se ha comentado, clínica e histológicamente la lesión es difícil de diferenciar del sarcoma de Kaposi por lo que es obligado la biopsia de estas lesiones. En la peliosis hepática se observan dilataciones capilares y múltiples hemangiomas cavernosos. El diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Bartonella* spp. se basa en técnicas como la detección de anticuerpos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el cultivo. El diagnóstico serológico es el más utilizado. Las técnicas para detectar anticuerpos séricos son la inmunofluorescencia indirecta y las pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA). Dependiendo de la forma de obtención del antígeno (agar o cultivo celular) la respuesta serológica varía. Por otro lado, la presencia de variantes genotípicas (*B. henselae* Houston; *B. henselae* Marsella) puede explicar la existencia de discordancias serológicas. El punto de corte de diagnóstico para los pacientes con enfermedad por arañazo de gato es un título de IgG 1:64 y en aquellos con endocarditis 1:800. Por otro lado, entre *B. henselae* y *B. quintana*

existen reacciones cruzadas, lo mismo que con otras especies de género *Chlamydia* y con *C. burnetii*^{39, 86}. La serología frente a *Bartonella* spp. puede ser negativa en los pacientes infectados por el VIH. Mediante técnicas moleculares de amplificación se pueden identificar *Bartonellas* spp. de diferentes muestras (sangre, adenopatía, etc.). Por último, las bacterias del género *Bartonella* pueden ser cultivadas mediante siembra en agar o mediante cultivos celulares. El cultivo en placas convencionales no es fácil, y requiere de incubaciones prolongadas (hasta 6 semanas de incubación). El crecimiento de los subcultivos en placas de agar sangre es más rápido (3-5 días). La rentabilidad diagnóstica mejora si previamente al cultivo se someten los tubos de sangre a congelación (24 h a -85 °C) y posterior descongelación a temperatura ambiente con el fin de destruir los hematíes y facilitar la salida de las bartonellas al exterior. A diferencia de los métodos de cultivo convencional, los medios de cultivo que emplean líneas celulares (células endoteliales L929, HeLa) son más sensibles y en ellos el crecimiento es más rápido⁸⁷. Uno de los medios más sensibles para el crecimiento de las bartonellas es el medio aerobio BACTEC. Durante su incubación, y con independencia de que el sistema de hemocultivos no detecte el crecimiento de bacterias (las bartonellas producen escaso CO₂), en aquellos casos en los que se sospeche la infección por *Bartonella* spp. se deben realizar exámenes sistemáticos de los frascos mediante tinción con naranja-acridina^{39, 87}.

El tratamiento de la infección por *Bartonella* va a depender de la especie y de la manifestación clínica, no estando estandarizado en todos los casos. En la enfermedad por arañazo de gato no está recomendado en general el tratamiento antibiótico, y en la angiomatosis bacilar se utiliza doxiciclina o eritromicina durante al menos tres meses⁸¹

VI. *Ehrlichia* y *Anaplasma*: la ehrlichiosis y anaplasmosis humanas son enfermedades febriles agudas, transmitidas por garrapatas, y que están provocadas por diferentes géneros de *Ehrlichia* y *Anaplasma* (*Anaplasmataceae*). En Europa sólo se han detectado casos de anaplasmosis humana granulocítica (AHG) que está provocada por *Anaplasma phagocytophilum*. La AHG guarda paralelismo con la borreliosis de Lyme, con la que comparte vector y reservorios. En Norteamérica, además de la AHG, existe la ehrlichiosis humana monocítica causada por *E. chaffeensis* y se han comunicado infecciones por *E. ewingii* en pacientes inmunodeprimidos. Tanto las *Ehrlichias* spp. como *A. phagocytophilum* tienen un tropismo especial por las células sanguíneas y en especial por los leucocitos/plaquetas, y provoca en los infectados una disminución importante de estos elementos. Se debe sospechar una AHG en pacientes picados por garrapatas o que están en su ambiente epidemiológico y que presenten fiebre (síndrome pseudogripal), leucopenia y trombocitopenia. En el área occidental son tres las especies de ehrlichias que tienen importancia por su incidencia y potencial gravedad *E. chaffeensis*, agente productor de la ehrlichiosis humana monocítica (EHM); *A. phagocytophilum* (denominación actual que engloba a los antiguamente denominados: agente de la ehrlichiosis humana granulocítica, *E. phagocytophila* y *E. equi*) productora de la anaplasmosis^{88, 89}

VII. Tuberculosis: La tuberculosis (TBC) debe ser considerada siempre en el diagnóstico diferencial de la fiebre de origen desconocido. Refiriéndonos evidentemente a la tuberculosis extrapulmonar y diseminada principalmente, puesto que las formas pulmonares clásicas serían fácilmente identificables a través de una radiografía de tórax y por la clínica respiratoria acompañante. Los datos más recientes sobre incidencia de la tuberculosis según datos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) indican una incidencia de 4,6 casos de TBC por 100000 habitantes en el año 2006 en Estados Unidos (EU), lo que representa una disminución del 3,2% respecto a las cifras del

2005. Estas cifras son las más bajas recogidas desde el año 1953 cuando comenzó el recuento, pero se ha observado un enlentecimiento de este descenso desde el año 2000, Otra de las características más importantes observada en los últimos años en esta enfermedad es el aumento relativo en las cifras de TBC extrapulmonar declaradas. A pesar del descenso en el número de casos de TBC en EU, las formas extrapulmonares disminuyen de forma mucho más lenta y suponen aproximadamente el 20% de los casos declarados⁹⁰. En Europa, en 2005 se notificaron en la región OMS de Europa 426.717 casos de TB con una tasa de incidencia de 48/100.000 habitantes. La incidencia de la tuberculosis muestra una gran diferencia entre las distintas zonas del continente, de forma que los 15 países de la Unión Europea antes de la ampliación de 2004 mostraban una tasa de incidencia de 10,7/100.000 habitantes, mayor en los 12 adheridos a la UE en 2004 (48,7/100.000 habitantes) y mayor aún en la subregión del Este (Rusia y el resto de países de la antigua Unión Soviética) con una tasa media de incidencia de 110/100.000 habitantes. Dentro de los nuevos incorporados a la UE es de destacar la alta tasa de incidencia de Rumanía con 135 casos notificados por 100000 habitantes⁹¹

La tuberculosis extrapulmonar y las formas diseminadas son más frecuentes en pacientes ancianos e inmunodeprimidos, incluyendo la infección por el VIH. La localización más frecuente de las formas extrapulmonares son la linfática, pleural y osteoarticular. Es necesario una alto índice de sospecha para el diagnóstico. El médico debe pensar siempre en tuberculosis en nuestro medio ante un paciente con fiebre de origen desconocido⁹².

b. Víricas

- i. **Citomegalovirus:** El citomegalovirus humano (CMV) es, por su complejidad, el mayor virus que afecta a la especie humana. Está ampliamente distribuido en todas las poblaciones, en las que establece infecciones latentes. La complejidad biológica y las características genéticas del CMV se relacionan íntimamente con la patogenia y la evolución natural de las infecciones humanas, muy en particular con la capacidad moduladora de la respuesta inmunitaria del hospedador, con quien, a lo largo de muchos siglos de evolución conjunta, ha establecido un estado cercano al comensalismo. Desde este punto de vista, el CMV debe considerarse un oportunista típico que sólo en determinadas circunstancias originará infecciones que cursen con síntomas. El espectro de manifestaciones clínicas es amplísimo, desde la infección latente hasta cuadros de extraordinaria gravedad, tanto en los pacientes previamente sanos (p.ej. algunas infecciones congénitas) como, más comúnmente, en los pacientes inmunodeprimidos. En los trasplantados es el virus que causa más morbilidad y mortalidad. Sin embargo, la mayor parte de las infecciones activas que se producen en el total de la población serán asintomáticas o con manifestaciones muy inespecíficas. Por esta razón, en la práctica clínica, el diagnóstico debe apoyarse en pruebas de laboratorio, cuya interpretación no está exenta de complejidad, a pesar de los avances indudables que se han producido en los últimos años. También se ha avanzado mucho en el tratamiento y la profilaxis, con la disponibilidad de algunos fármacos con actividad anti-CMV; sin embargo, tampoco en este campo los resultados son óptimos⁹³⁻⁹⁶.

El CMV, también denominado herpesvirus humano tipo 5, pertenece a la subfamilia *Betaherpesviridae*, de la familia *Herpesviridae*. Su nombre deriva del efecto citopático típico de las células que infecta: un agrandamiento celular con presencia de inclusiones nucleares basófilas y también citoplasmáticas. La infección por este

virus es específica de los seres humanos, de forma similar, de forma similar a lo que ocurre con otros CMV de mamíferos, con quienes sólo guarda un grado de homología moderado^{93, 96}.

Como herpesvirus que es, el CMV guarda una arquitectura característica y muy parecida a la del resto del grupo. Se trata de un virus con DNA, envuelto de unos 180-200nm, ligeramente pleomórfico. El genoma del CMV está formado por una doble cadena de DNA. Tiene forma lineal y su tamaño es mayor que el de los restantes herpesvirus, lo que se corresponde con una mayor complejidad genética. La estructura de su genoma tiene similitud con otros virus de la familia. Todas las cepas de CMV humanas tienen un elevado grado de homología y no es posible clasificarlas en tipos y subtipos, aunque sí pueden encontrarse diferencias que permitan la tipificación con fines epidemiológicos^{93, 96}.

Como en todos los miembros de la familia, la capacidad de latencia es la característica biológica más destacada del CMV, pero a diferencia de los demás, el espectro de tipos celulares en los que lleva a cabo este proceso es muy amplio. La reactivación está relacionada con la inmunidad del individuo, en especial, la de tipo celular, pero las causas últimas que la desencadenan no se conocen con detalle^{93, 96}.

Patogenia e inmunidad: La infección por el CMV se produce a través de tres vías diferentes: la infección primaria, la reactivación de una cepa latente y la reinfección por una cepa externa. Sólo una pequeña parte de estas infecciones es sintomática. La aparición o no de síntomas está determinada, principalmente por la situación inmunitaria del hospedador. Como respuesta a la infección primaria se producen anticuerpos del tipo IgM, IgG e IgA que, por sí mismos, no confieren protección frente al CMV. Es la respuesta celular mediada por linfocitos citocidas naturales (NK, *natural killers*) y, sobre todo, por los linfocitos T citotóxicos, la que consigue el control de la infección primaria. De esta manera el CMV queda en estado de latencia permanente

tanto en las células circulantes, polimorfonucleares y linfocitos T, como tisulares, células del endotelio vascular y del epitelio renal^{93, 96}.

La reactivación del virus latente se produce cuando el sistema inmunitario del hospedador se debilita como consecuencia principalmente del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del tratamiento inmunosupresor en los receptores de trasplante. No hay datos que sugieran que la reactivación o la enfermedad se deban a factores de virulencia del virus. La replicación del CMV ocurre fundamentalmente en el núcleo de la célula infectada; por esta razón, las células gigantes con inclusiones intranucleares, son la marca para el diagnóstico histológico de la enfermedad. El efecto sobre las células del sistema inmunitario del huésped, provoca con relativa frecuencia la coinfección con otros microorganismos oportunistas, en los receptores de trasplantes como *Pneumocystis jirovecii* y *Aspergillus fumigatus*. Asimismo, se ha relacionado con otros dos herpesvirus: el virus de Epstein-Barr y el herpes humano tipo 6, de los que hablaremos posteriormente. Más concretamente, se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad proliferativa por el virus de Epstein-Barr, aunque se desconoce la importancia real de esta relación. A pesar de lo apuntado por estudios antiguos no se ha demostrado la capacidad oncogénica del CMV^{93, 96}.

Epidemiología: La infección se produce por un contacto directo, estrecho y prolongado entre el individuo infectado y el susceptible. El virus puede detectarse en múltiples órganos, tejidos y fluidos biológicos como saliva, orina, sangre, leche materna, secreciones respiratorias y vaginales, etc.. siendo éstos los vehículos de transmisión habituales.

Prevalencia en la población general

El CMV está ampliamente distribuido en la población general y en todas las áreas geográficas. La experiencia acumulada indica que la infección inicial se traduce en la presencia de anticuerpos detectables de por vida, por lo que la serología es un importante marcador epidemiológico. Las encuestas serológicas demuestran que la proporción de individuos infectados varía entre el 50 y el 100%. La frecuencia en una población en particular estará determinada por las diferentes oportunidades que los hábitos de vida concretos otorguen a la transmisión. En los países de climas cálidos, casi toda la población adulta está infectada, frente al 50% de los países occidentales templados, lo que sin duda refleja los diferentes hábitos de higiene relacionados con el nivel socioeconómico, y no las condiciones climáticas, puesto que la frecuencia también es muy elevada en los esquimales. En España, la prevalencia es del 70-80% con una tendencia a la baja según las últimas encuestas. La edad también es un factor clave en la incidencia de la infección. A diferencia de otros herpes, el incremento es progresivo y sólo se modera en las etapas más avanzadas de la vida. Aunque puede haber variaciones, en general se observan dos picos de mayor incidencia: la edad infantil temprana y las etapas juveniles. La propia prevalencia de la infección en la población también es un factor que se ha de tener en cuenta, puesto que incrementa la oportunidad a las secreciones infectantes. En este sentido, un elemento de gran influencia en las sociedades urbanas es la asistencia a guarderías, donde se dan los dos factores claves: la mayor frecuencia de excreción en la orina y la saliva de estos niños, así como los hábitos que facilitan el contacto próximo y la transmisión a compañeros, cuidadores y familiares. Aunque el CMV se ha aislado de objetos inanimados (juguetes), no parece que tengan significación epidemiológica. Se ha sugerido cierta predisposición genética relacionada con el tipo HLA, pero no hay resultados concluyentes al respecto⁹³.

La infección por el CMV es una importante causa de morbimortalidad en recién nacidos e inmunodeprimidos, pero teniendo en cuenta el tema central de nuestro trabajo, nos centraremos en adultos jóvenes y pacientes inmunocompetentes.

Pasada la etapa perinatal, cambia la importancia relativa de los mecanismos de transmisión. Los últimos estudios de prevalencia en sociedades desarrolladas muestran dos picos, uno en edades comprendidas entre los 3-6 años y otro en la adolescencia, que están relacionados con la escolarización temprana y con el inicio de la actividad sexual, respectivamente. En adultos sanos también intervienen otros mecanismos de transmisión como la parenteral. Por estas razones, la infección por CMV en determinadas poblaciones puede tener una prevalencia cercana al 100%, como los varones homosexuales, los heterosexuales promiscuos y los usuarios de drogas por vía parenteral. Con respecto a la transfusión de sangre y derivados, hay estudios que estiman un riesgo de hasta el 15% por unidad transfundida, pero es posible, que sea más elevada en países con una prevalencia alta en la población general. Los sistemas de filtración de leucocitos, reducen el riesgo de transmisión pero no completamente.^{93, 96}

Manifestaciones clínicas: Las manifestaciones clínicas de la infección por CMV van a depender del estado inmunológico del huésped. Así, en las personas sanas, la infección por el CMV es casi siempre asintomática, mientras que en pacientes inmunodeprimidos es una causa principal de morbimortalidad. La primoinfección en pacientes inmunocompetentes da lugar a un síndrome mononucleósico en la mayoría de los casos. En adultos jóvenes de hecho, el CMV es la primera causa de síndrome mononucleósico con anticuerpos heterófilos negativos. La fiebre, que es el síntoma principal, se prolonga 2-3 semanas y se acompaña de mialgias y postración. Al contrario de lo que ocurre en la mononucleosis producida por el virus de Epstein-Barr, la odinofagia, la amigdalitis, la esplenomegalia y las adenopatías son poco frecuentes.

La linfocitosis relativa, mayor del 50% es la alteración analítica característica, y más del 10% de esos linfocitos son atípicos con alteraciones en la morfología del núcleo. Frecuentes aunque más inespecíficas son el aumento de las transaminasas, la trombopenia y la anemia, generalmente de escasa entidad. La mayoría de los pacientes curan de forma espontánea sin secuelas, pero algunas quedan con astenia prolongada y otros, de forma excepcional desarrollan complicaciones. Entre éstas se han descrito casos de hepatitis, miocarditis, meningoencefalitis, síndrome de Guillain-Barré, neumonía intersticial, trombopenia extrema y anemia hemolítica^{95, 97, 98}.

Diagnóstico: La principal herramienta más utilizada hoy en día en pacientes inmunocompetentes es la serología. La inmunofluorescencia indirecta es más sensible que la fijación de complemento, permite la detección individualizada de distintos tipos de anticuerpos, pero genera falsos positivos por la presencia de receptores Fc, inducidos por el CMVH, en las células infectadas que sirven de sustrato antigénico de la reacción. En las personas inmunocompetentes, los anticuerpos séricos de clase IgM frente a CMVH son detectables 7-12 días después de la infección primaria, y tardan 2-3 semanas en alcanzar su nivel máximo. Después, decrecen paulatinamente hasta ser indetectables unos meses más tarde. No obstante lo anterior, las IgM pueden persistir en el suero un año o más tras la primoinfección, aún en ausencia de infección activa (replicación del virus). Los anticuerpos de clase IgG pueden detectarse en el suero a las 4-6 semanas posteriores a la infección y, aunque su nivel declina, generalmente persisten en el suero de por vida, si bien en concentraciones bajas. La avidéz con que estos anticuerpos se unen al CMVH aumenta con el tiempo (maduración de la afinidad), alcanzando su máximo a los 4-5 meses tras la infección. Por otra parte, es conveniente precisar que los anticuerpos que detectan todos los procedimientos serológicos disponibles, a excepción de la técnica de seroneutralización, reconocen mayoritariamente proteínas del tegumento (fosfoproteínas) del virus y no glucoproteínas de su membrana, por lo que en modo alguno existe correlación entre el

grado de protección frente al CMVH circulante, que sólo confieren los anticuerpos capaces de neutralizarlo, y el nivel de anticuerpos determinado por estos métodos. La reactivación de la infección latente y la reinfección por una cepa heterotípica generan un efecto booster, que suele traducirse en un incremento apreciable del nivel basal de los anticuerpos IgG. Aunque en estas circunstancias la reaparición de las IgM en el suero es posible, no es lo habitual⁹⁹.

En la última década se ha avanzado mucho en el diagnóstico de la infección, sobre todo en pacientes trasplantados e inmunodeprimidos en general. La detección rápida de virus en sangre (viremia), la cuantificación del antígeno pp65 en leucocitos de sangre periférica (antigenemia) y la cuantificación del genoma viral en sangre mediante técnicas de PCR en tiempo real, han permitido la administración de tratamiento incluso en fases asintomáticas de la infección (tratamiento anticipado). Lo que ha reducido notablemente la morbilidad y la mortalidad entre los receptores de trasplantes^{94, 95, 100-102}.

- ii. **Virus de Epstein-Barr:** El virus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*, EBV) es el microorganismo causal de la mononucleosis infecciosa (*infectious mononucleosis*, IM) con anticuerpos heterófilos positivos, que se caracteriza por fiebre, faringitis, adenopatías y linfocitosis atípica. El EBV también se vincula con diversos tumores de los seres humanos, como el carcinoma nasofaríngeo, el linfoma de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin y (en pacientes con inmunodeficiencias) el linfoma de células B. El virus pertenece a la familia Herpesviridae y consta de un núcleo de DNA bicatenario lineal rodeado de una nucleocápside icosaédrica y de la envoltura vírica que contiene glucoproteínas. Los dos tipos de EBV, ambos muy prevalentes en la naturaleza, no se distinguen mediante pruebas serológicas convencionales⁹³.

Patogenia e inmunidad: El EBV se transmite por la saliva. El virus infecta al epitelio de la bucofaringe y de las glándulas salivales y se elimina desde estas células. Así

como las células B pueden infectarse tras entrar en contacto con las células epiteliales, los estudios indican que los linfocitos de las criptas amigdalinas se pueden infectar directamente. A continuación el virus se disemina por la circulación sanguínea. Durante la IM la proliferación y la expansión de las células B infectadas por el EBV junto con las células T reactivas inducen una tumefacción del tejido linfático. La activación policlonal de las células B favorece la producción de anticuerpos frente a las proteínas víricas y de la célula hospedadora. Durante la fase aguda de la mononucleosis infecciosa, aproximadamente una de cada 100 células B de la sangre periférica está infectada, mientras que después de la recuperación de la enfermedad está infectada una a 50 de cada millón. Durante la IM existe una inversión del índice de células T CD4+/CD8+. El porcentaje de linfocitos T CD4+ disminuye, mientras que se producen extensas expansiones clonales de linfocitos T CD8+; durante la infección aguda hasta 40% de los linfocitos T CD8+ se dirigen contra los antígenos del EBV. Los datos sugieren que las células B de memoria, no las células epiteliales, son el reservorio de los EBV en el organismo. Cuando los pacientes reciben aciclovir, cesa la dispersión del virus desde la bucofaringe, pero la partícula persiste en los linfocitos B⁹³.

El receptor del EBV (CD21), presente en la superficie de las células B y de las células epiteliales, es también el receptor del componente C3d del complemento. Tras la infección de las células epiteliales por el EBV, éste se replica y se originan viriones. Cuando se infectan células B con EBV *in vitro*, éstas se transforman y pueden proliferar por tiempo indefinido. Durante la infección latente de las células B sólo se expresan *in vitro* los antígenos nucleares del virus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus nuclear antigens*, EBNA), las proteínas latentes de membrana (*latent membrane proteins*, LMP) y pequeños RNA del EBV. Las células B transformadas por el EBV secretan inmunoglobulinas; sólo una pequeña fracción de las células produce virus⁹³.

En el control de la infección por el EBV es más importante la inmunidad celular que la humoral. En la fase inicial de la infección, las células T supresoras, las células citolíticas y las células T citotóxicas inespecíficas son importantes en el control de la proliferación de las células B infectadas por el EBV. Los niveles de marcadores de activación de células T y de interferón (IFN) gamma sérico están elevados. En estadios avanzados de la infección se producen células T citotóxicas restringidas por el antígeno leucocítico humano (*human leukocyte antigen*, HLA) que reconocen los EBNA y las LPM y destruyen las células infectadas por el EBV. Los estudios demuestran que uno de los genes tardíos expresados durante la replicación del EBV, el *BCRF1*, es un homólogo de la interleucina 10 y es capaz de inhibir *in vitro* la producción de interferón gamma por las células mononucleares⁹³.

Si la inmunidad de las células T está afectada, las células B infectadas por el EBV pueden comenzar a proliferar. Cuando el EBV se vincula con un linfoma, la proliferación inducida por el EBV es un paso más en la cadena de la transformación neoplásica. En muchos tumores que contienen el EBV, la LMP-1 imita a los miembros de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (p. ej., el CD40), transmitiendo señales de crecimiento-proliferación⁹³.

Epidemiología: Las infecciones por el EBV tienen una distribución mundial. Son más frecuentes al principio de la infancia y presentan un segundo pico de frecuencia al final de la adolescencia. En la edad adulta, más de 90% de los individuos han sido infectados por el virus y han desarrollado anticuerpos contra él. En general, la mononucleosis infecciosa es una enfermedad de adultos jóvenes. En los grupos de nivel socioeconómico bajo y en zonas geográficas con un nivel de higiene deficiente (p. ej., países en vías de desarrollo), el EBV tiende a infectar a los niños a edades tempranas, y la mononucleosis infecciosa sintomática es infrecuente. En regiones con

un nivel de higiene mayor, la infección con frecuencia se retrasa hasta la edad adulta y la IM es más prevalente¹⁰³.

El EBV se propaga mediante el contacto con las secreciones bucales. Se transmite con frecuencia de adultos a niños y entre adultos jóvenes por transferencia de saliva durante el beso. El contagio a través de contactos menos íntimos es poco habitual. El EBV se ha transmitido en transfusiones sanguíneas y en el trasplante de médula ósea. Más de 90% de los individuos seropositivos asintomáticos eliminan el virus en las secreciones bucofaríngeas. La diseminación aumenta en enfermos inmunodeficientes y en los que tienen mononucleosis infecciosa¹⁰³.

Manifestaciones clínicas: La mayoría de las infecciones por el EBV que se producen en lactantes o en niños pequeños son asintomáticas o causan una faringitis leve, con o sin amigdalitis. Por lo contrario, hasta 75% de las infecciones en adolescentes provocan mononucleosis infecciosa. El cuadro inicial de la mononucleosis infecciosa en los ancianos muy a menudo es inespecífico e incluye fiebre duradera, fatiga, mialgias y malestar general. A diferencia de ello en dicho grupo de personas son relativamente raras manifestaciones como faringitis, linfadenopatía, esplenomegalia y linfocitos atípicos¹⁰³.

El periodo de incubación de la IM en los adultos jóvenes es de cuatro a seis semanas. Un periodo prodrómico debido a fatiga, malestar general y mialgias puede preceder en una o dos semanas a la aparición de fiebre, faringitis y adenopatías. La fiebre suele ser leve y es más frecuente en las dos primeras semanas de la enfermedad, aunque puede persistir más de un mes. La adenopatía y la faringitis predominan durante las dos primeras semanas, mientras que la esplenomegalia lo hace durante la segunda y la tercera semanas. Las adenopatías suelen afectar a la cadena cervical posterior, aunque pueden ser generalizadas. Suelen ser sensibles con la palpación y simétricas, pero no se encuentran fijas. La faringitis suele ser el signo más destacado y puede

acompañarse de tumefacción de las amígdalas, con un exudado que se asemeja al de la faringitis estreptocócica. En casi 5% de los casos aparece un exantema morbiliforme o papuloso, que suele asentar sobre los brazos o el tronco. La mayoría de los pacientes tratados con ampicilina manifiesta un exantema maculoso, el cual no es un factor predictivo de futuras reacciones adversas a las penicilinas. También se ha descrito la aparición de eritema nudoso y de eritema multiforme. Los síntomas suelen durar entre dos y cuatro semanas, pero el malestar general y la dificultad para concentrarse pueden persistir durante meses¹⁰³.

Diagnóstico: En el hemograma el recuento leucocítico suele estar elevado y alcanza un máximo de 10 000 a 20 000/ μ l en la segunda o tercera semana de la enfermedad. Por lo general se demuestra linfocitosis, con más de 10% de linfocitos atípicos, los cuales son linfocitos agrandados con abundante citoplasma, vacuolas y muescas de la membrana celular. Entre los linfocitos atípicos predominan las células CD8+. Durante el primer mes de la enfermedad es habitual encontrar neutropenia y trombocitopenia de bajo grado. La función hepática está alterada en más de 90% de los casos. Los niveles en plasma de aminotransferasas y de fosfatasa alcalina suelen estar ligeramente elevados; en cerca de 40% de los casos se encuentra elevada la concentración sérica de bilirrubina^{93, 103}.

Serología: En los niños y en los adultos, para establecer el diagnóstico de la IM se utiliza la prueba de anticuerpos heterófilos. En la prueba para este anticuerpo, el suero humano se adsorbe con riñón de cobaya y el título de anticuerpos heterófilos se define como la mayor dilución de suero que aglutina eritrocitos de carnero, caballo o vaca. Los anticuerpos heterófilos se fijan en algunos eritrocitos de animales, pero no interactúan con proteínas de EBV. En un paciente con síntomas compatibles con IM y linfocitos atípicos un aumento en los títulos de 40 veces o más es diagnóstico de infección aguda por el EBV. Durante la primera semana de la enfermedad las pruebas de anticuerpos heterófilos son positivas en 40% de los pacientes con IM y en 80 a

90% durante la tercera semana. Por tanto, quizá se requiera repetir la prueba, especialmente si el estudio inicial se realizó en fases tempranas de la enfermedad. Las pruebas suelen permanecer positivas durante tres meses tras el inicio de la enfermedad, pero los anticuerpos heterófilos pueden persistir hasta un año. Estos anticuerpos no suelen ser detectables en niños menores de cinco años de edad, en ancianos, ni en pacientes con síntomas no típicos de IM. La prueba "monospot", disponible comercialmente para los anticuerpos heterófilos, es algo más sensible que la prueba de anticuerpos heterófilos clásica. El método monospot tiene una sensibilidad cercana a 75% y una especificidad de 90%, en comparación con los estudios serológicos específicos de EBV. Los resultados positivos falsos con dicho método son más frecuentes en personas con enfermedades del tejido conectivo, linfoma, hepatitis vírica y paludismo⁹³.

La prueba de anticuerpos específicos frente al EBV se utiliza en pacientes con una presunta infección aguda por este virus que no tienen anticuerpos heterófilos, y en pacientes con infecciones atípicas. Los títulos de anticuerpos IgM e IgG frente a los antígenos de cápside vírica (*víric capsid antigen*, VCA) en el momento del inicio de la enfermedad están elevados en el suero en más de 90% de los pacientes. El anticuerpo IgM frente a VCA es útil para establecer el diagnóstico de la IM aguda porque está presente en títulos altos sólo durante los dos o tres primeros meses de la enfermedad; en cambio, el anticuerpo IgG frente a VCA se utiliza mucho para diagnosticar IM, pero también para valorar la exposición al EBV en el pasado, ya que persiste toda la vida. La seroconversión a la positividad de EBNA también es útil para diagnosticar la infección aguda por EBV. Los anticuerpos contra EBNA son detectados en un periodo relativamente tardío (tres a seis semanas después de comenzar los síntomas) en casi todos los pacientes con infección aguda por el virus y persisten toda la vida. Dichos anticuerpos quizá no aparezcan en individuos inmunodeficientes y en quienes tienen la infección activa crónica por virus de Epstein-Barr⁹³.

En la mononucleosis infecciosa también aumentan los títulos de otros anticuerpos; sin embargo, dichos incrementos son menos útiles en el diagnóstico. Los anticuerpos contra antígenos tempranos (*early antigens*, EA) aparecen con un patrón difuso en el núcleo y citoplasma de células infectadas (anticuerpo EA-D) o se limita al citoplasma (anticuerpo EA-R). Los anticuerpos en cuestión se detectan tres a cuatro semanas después de comenzar los síntomas en individuos con IM. Alrededor de 70% de personas con IM tienen anticuerpos EA-D en la evolución de su enfermedad; la presencia de dichos anticuerpos es frecuente, en particular en individuos con enfermedad relativamente intensa. En general, los anticuerpos persisten sólo tres a seis meses. Los niveles de anticuerpos EA-D también aumentan en individuos con carcinoma nasofaríngeo o con infección activa crónica por EBV. Los anticuerpos EA-R se detectan sólo ocasionalmente en sujetos con IM, pero a veces surgen títulos altos en pacientes de linfoma de Burkitt africano o infección activa crónica por EBV. Los anticuerpos de IgA contra antígenos de EBV han sido útiles para identificar a pacientes del carcinoma recién señalado o en personas con alto riesgo de desarrollar la enfermedad^{93, 103}.

PCR y técnicas moleculares: La detección de DNA, RNA o proteínas del EBV ha sido útil para demostrar la relación del virus con diversas neoplasias malignas. Se ha utilizado la reacción en cadena de polimerasa para detectar DNA del EBV en el LCR de algunos enfermos con SIDA y linfomas, así como para controlar la cantidad de DNA del EBV presente en la sangre de pacientes con enfermedad linfoproliferativa. La detección de niveles altos de DNA de EBV en la sangre en las primeras semanas de la mononucleosis infecciosa puede ser útil si los estudios serológicos generan resultados equívocos. El cultivo del EBV obtenido de lavados faríngeos o de la sangre no es útil en el diagnóstico de la infección aguda, ya que el EBV suele persistir en la bucofaringe y en las células B durante toda la vida del individuo infectado¹⁰⁴.

Diagnóstico diferencial:

En promedio, 90% de los casos de IM son causados por EBV, pero 5 a 10% de los casos provienen del ataque de citomegalovirus (CMV); este último es la causa más frecuente de mononucleosis heterófila-negativa que por lo común aparece por primera vez en ancianos. La IM causada por CMV se acompaña de una menor frecuencia de faringitis, esplenomegalia y linfadenopatía, en comparación con la mononucleosis causada por EBV. Entre las causas menos frecuentes de IM están infección aguda por *Toxoplasma*, VIH, virus herpético humano 6 y virus de hepatitis, así como reacciones de hipersensibilidad a fármacos. Otras enfermedades que comparten alguna de las características de la IM son la rubéola, la linfocitosis infecciosa aguda en niños y el linfoma o la leucemia¹⁰³.(Harrison 17ª edición parte 7.sección 12, capítulo 174)

- iii. **Parvovirus B19:** El parvovirus B19 (PVB19) es el miembro del género *Erythrovirus*. Con base en la secuencia vírica, el B19 se divide en tres genotipos (1, 2 y 3), aunque se ha descrito solamente un tipo antigénico, B19. Los genotipos 2 y 3 se detectan muy pocas veces en Estados Unidos y Europa¹⁰⁵.

Epidemiología: El parvovirus B19 infecta exclusivamente a humanos y de hecho en cualquier parte del mundo su ataque es endémico. La transmisión se hace más bien por la vía respiratoria y después aparecen erupciones y artralgias. A la edad de 15 años, en promedio, la mitad de los adolescentes tienen IgG detectable, cifra que aumenta a más de 90% en los ancianos. En embarazadas, el índice calculado de seroconversión anual es de 1%, en promedio. En núcleos familiares los índices de infección secundaria se acercan a 50 por ciento¹⁰⁵.

No es raro detectar una concentración elevada en sangre. La transmisión sucede como consecuencia de transfusión, muy a menudo de componentes hemáticos de

diversos donantes. Para reducir el riesgo de transmisión, el plasma acumulado de diversos donantes se estudia por tecnologías de amplificación de ácido nucleico y se descartan los conjuntos con concentraciones elevadas de los virus. El B19 es resistente a la inactivación térmica y la que se hace con solventes-detergentes¹⁰⁵.

Patogenia: El virus B19 muestra réplica predominantemente en progenitores eritroides. Esta especificidad en parte se debe a la escasa distribución hística del receptor de B19, un antígeno del grupo P en la sangre (globósido). La infección ocasiona viremia en grado extraordinario (concentración elevada) donde en el punto más intenso se detectan en la sangre más de 10^{12} partículas víricas/ml y la citotoxicidad inducida por el virus hace que cese la producción de la línea eritroide. En personas inmunocompetentes, la viremia y la detención de la eritropoyesis son transitorias y muestran resolución en la medida en que surge una respuesta a base de anticuerpos IgM e IgG. En personas con eritropoyesis normal aparece sólo una disminución mínima en los valores de hemoglobina; sin embargo, en el caso de que haya mayor eritropoyesis (especialmente si hay anemia hemolítica), esta interrupción de la eritropoyesis puede inducir una crisis transitoria con anemia intensa. En forma similar, si la persona (o después de infección de la madre, el feto) no desencadena una respuesta con anticuerpos neutralizantes y frena la infección lítica, disminuirá la producción eritroide y aparecerá anemia crónica. La fase regulada por mecanismos inmunitarios, que comienza dos a tres semanas después de la infección y al alcanzar su máximo la respuesta a base de IgM, se manifiesta por eritema infeccioso, así como con artralgias, artritis franca o ambos componentes. Es posible detectar la concentración del DNA de B19 por reacción en cadena de polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) en sangre y tejidos, durante meses o años después de la infección aguda¹⁰⁵.

El receptor de B19 aparece en otras células y tejidos como megacariocitos, células endoteliales, placenta, miocardio e hígado. La infección de estos tejidos pudiera ser el punto de partida de algunas de las variantes más raras de la infección. Los pocos individuos que no tienen antígeno P son resistentes naturalmente a la infección por PVB19¹⁰⁵.

Manifestaciones clínicas

Eritema infeccioso: Gran parte de las infecciones por B19 son asintomáticas y cuando generan síntomas el signo principal es eritema infeccioso antes llamado *quintanao enfermedad de carrillos abofeteados*. La infección inicia con un pródromo febril de poca intensidad alrededor de siete a 10 días luego de la exposición y días después aparece el clásico eritema facial. Este signo se puede propagar a las extremidades con una disposición reticular laxa. Sin embargo, varían su intensidad y distribución y el eritema inducido por B19 es difícil de diferenciar de otros exantemas víricos. Es posible que los adultos no presenten el eritema¹⁰⁵.

Síndrome de poliartropatía: La artropatía, si bien es poco frecuente en niños, afecta en promedio a 50% de los adultos y es más común en mujeres que en varones.

La distribución en las articulaciones suele ser simétrica y la artralgia afecta las articulaciones pequeñas de las manos y a veces los tobillos, las rodillas y las muñecas. En pocas semanas desaparece, pero los síntomas repetitivos pueden persistir durante meses¹⁰⁵.

Diagnóstico: El diagnóstico de infección por B19 en personas inmunocompetentes por lo general se basa en la detección de anticuerpos de tipo IgM contra el virus. La IgM se detecta en el momento en que aparece el eritema infeccioso y para el tercer día de TAC (crisis aplásicas transitorias) en personas con enfermedades hematológicas; el anticuerpo sigue siendo detectable durante tres meses, en promedio. La IgG contra B19 es detectable el séptimo día de la enfermedad y persiste

toda la vida. La detección del DNA de B19 se utiliza para el diagnóstico de la fase temprana de TAC o de anemia crónica. Las concentraciones del virus disminuyen rápidamente con el surgimiento de la respuesta inmunitaria, pero se puede detectar DNA por medio de PCR durante meses o incluso años después de la infección, en personas sanas, inclusive; por tal motivo habrá que recurrir a la PCR cuantitativa. En la infección aguda, en el punto máximo de la viremia se detectan más de 10^{12} equivalentes del genoma de DNA de B19 (*genome equivalents, ge*)/ml de suero; sin embargo, estos títulos disminuyen rápidamente en dos días. Las personas con crisis aplásica o con anemia crónica inducida por B19 por lo general tienen más de 10^5 ge de DNA de B19/mililitro¹⁰⁵.

- iv. **Virus herpes humano 6, 7 y 8:** El herpesvirus humano (*human herpesvirus, HHV*) tipo 6 fue aislado por primera vez en 1986 a partir de leucocitos de sangre periférica de seis sujetos con diversos trastornos linfoproliferativos¹⁰⁶. Tiene una distribución mundial y en la actualidad se conocen dos variantes genéticamente distintas (HHV-6A y HHV-6B). Al parecer HHV-6 es transmitido por la saliva y posiblemente por secreciones genitales¹⁰⁶.

La infección por HHV-6 a menudo aparece en la lactancia conforme desaparecen en el cuerpo del lactante los anticuerpos maternos. La etapa máxima del contagio va de los nueve a los 21 meses y para los 24 meses la cifra de seropositividad ha llegado a 80%. Al parecer los hermanos mayores son el origen de la transmisión. También puede haber infección congénita. Muchos de los niños infectados terminan por mostrar síntomas (fiebre, confusión y diarrea). Una pequeña minoría presenta exantema súbito (roséola infantil), trastorno frecuente caracterizado por fiebre y, más adelante, erupción. En promedio, 10 a 20% de las crisis febriles sin erupción durante la lactancia son causados por herpesvirus humano tipo 6^{93, 106}.

En grupos de mayor edad, el HHV-6 se ha vinculado con síndromes de mononucleosis, encefalitis focal y (en hospedadores inmunodeficientes) neumonitis y enfermedad diseminada. Entre quienes reciben un trasplante, la infección por HHV-6 puede ocasionar síndromes similares y disfunción del injerto. El gran número de partículas de DNA de HHV-6 en el plasma de quienes reciben trasplante de células madre se vincula con donantes con desigualdad de alelos, empleo de corticoesteroides, incorporación tardía de monocitos y plaquetas, aparición de encefalitis límbica y mayor mortalidad de todas las causas. Como otros muchos virus se ha implicado al HHV-6 en la patogénesis de la esclerosis múltiple, aunque se requiere investigar más a fondo para distinguir entre esta relación y la etiología^{93, 107}.

El HHV-7 se aisló en 1990 a partir de los linfocitos T de la sangre periférica de un varón sano de 26 años. El virus suele adquirirse a menudo en la niñez, aunque en una etapa más tardía que en el caso de HHV-6. En la saliva suele detectarse HHV-7 y se supone que pudiera ser el origen principal de la infección; la leche materna no contiene el virus. La viremia se vincula con infección primaria o reactiva. Las manifestaciones clínicas más comunes de las infecciones por HHV-7 en niños son fiebre y convulsiones. Algunos niños acuden con signos y síntomas respiratorios o gastrointestinales. Se ha establecido una relación entre el HHV-7 y la pitiriasis rosada, pero deberá confirmarse en otros estudios^{107, 108}.

Las infecciones por HHV-6, HHV-7 y CMV pueden acumularse de manera simultánea en los receptores de trasplantes, lo que dificulta el aclarar las funciones de los diversos microorganismos en los síndromes clínicos individuales. El HHV-6 y el HHV-7 parecen susceptibles al ganciclovir y al foscarnet, aunque no se tienen pruebas definitivas de las reacciones clínicas de estos virus a los fármacos mencionados¹⁰⁸.

Durante 1994 y 1995 se informaron secuencias de DNA únicas tipo herpesvirus en tejidos derivados del sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma*, KS) y de los linfomas de

cavidades corporales en pacientes con SIDA. En la actualidad se ha cultivado el virus del que se obtuvieron estas secuencias y se ha designado HHV-8 o herpesvirus relacionado con el sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*, KSHV). El HHV-8, que infecta a ciertos linfocitos B y células fusiformes derivadas del endotelio, parece estar relacionado desde el punto de vista causal no sólo con el KS, sino también con un subgrupo de linfomas de células B de las cavidades corporales relacionados con el SIDA (linfomas de derrame primarios) y con la enfermedad multicéntrica de Castleman, que es un trastorno linfoproliferativo de células B. Las sugerencias iniciales de que HHV-8 guardaba algún vínculo con la hipertensión pulmonar primaria no han sido confirmadas en estudios ulteriores⁹³.

A diferencia de las infecciones por otros virus herpéticos, la causada por HHV-8 es mucho más frecuente en algunas áreas geográficas (como las zonas centro y sur de África), que en otras (América del Norte, Asia, norte de Europa). En áreas de elevada prevalencia la infección surge en la niñez; la seropositividad se relaciona con la existencia de una madre seropositiva (o con menor frecuencia), con un hermano mayor seropositivo y HHV-8 puede transmitirse por la saliva. En áreas de baja prevalencia, de modo típico las infecciones afectan a los adultos, probablemente por transmisión sexual. Las epidemias simultáneas de infecciones por VIH-1 y HHV-8 en algunas poblaciones (varones homosexuales y bisexuales) entre 1975 y 1985 al parecer originaron la coexistencia frecuente de SIDA y de sarcoma de Kaposi. La transmisión del virus HHV-8 puede relacionarse con el trasplante de órganos y el consumo de drogas inyectables⁹³.

La infección primaria por HHV-8 en niños inmunocompetentes puede manifestarse en la forma de fiebre y maculopápulas. En personas con inmunidad intacta la norma es la infección crónica asintomática y los problemas neoplásicos suelen surgir sólo después de que se ha deteriorado el sistema inmunitario. El cuadro inicial en sujetos inmunodeficientes con la infección primaria incluye fiebre, esplenomegalia, hiperplasia

linfoide, pancitopenia o sarcoma de Kaposi de comienzo rápido. El análisis cuantitativo del DNA de HHV-8 sugiere que predominan células con infección latente en las lesiones del KS y hay réplica frecuente lítica en la enfermedad de Castleman^{93, 109}.

El tratamiento antirretrovírico eficaz de los infectados por el VIH ha producido una reducción importante en las tasas de KS entre infectados doblemente por HHV-8 y VIH en las regiones ricas en recursos. *In vitro*, el propio HHV-8 es susceptible a ganciclovir, foscarnet y cidofovir, aunque no se cuenta con comprobación clínica de la eficacia de estos medicamentos^{93, 108}.

- v. **Virus de la inmunodeficiencia humana:** La primoinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se manifiesta frecuentemente como un síndrome mononucleósico caracterizado por fiebre, rash y linfadenopatías entre el 40 y el 70% de los casos según las series³⁶. Estos síntomas suelen desaparecer espontáneamente en unas dos semanas por lo que en sus etapas iniciales puede manifestarse como una fiebre de duración intermedia. En la serie publicada por Genne and colleagues el 27% de los pacientes fueron diagnosticados de VIH como causa de FOD³⁶

b. Protozoos

- i. **Toxoplasmosis:** La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial, causada por *Toxoplasma gondii*, protozoo intracelular obligado. Se transmite al hombre por vía oral, a través de la ingesta de alimentos contaminados con los huevos del parásito (carne procedente de animales infectados ó tras la manipulación de tierra contaminada con huevos, generalmente procedentes de las heces de los gatos) y por vía congénita. En el hombre la incidencia de la seropositividad aumenta con IgG positiva a toxoplasma. El diagnóstico se realiza mediante técnicas serológicas (IFI para la detección de IgG e IgM). Desde el punto de vista clínico, en

la población adulta inmunocompetente solamente el 15% de la infección aguda es sintomática, en forma de adenopatías, que pueden acompañarse de fiebre, cefalea, astenia y artromialgias, aunque en ocasiones, el cuadro clínico puede limitarse a la fiebre exclusivamente, cuando las adenopatías se localizan en retroperitoneo¹¹⁰

c. Infecciones localizadas

- i. Abscesos intrabdominales:** Los abscesos intrabdominales se manifiestan en la mayoría de los casos como un síndrome febril con focalidad abdominal que varía según la localización del absceso, de esta forma el dolor abdominal, la diarrea y los vómitos son característicos de los abscesos hepáticos o intraperitoneales y de la colecistitis crónica. En muchos casos de abscesos hepáticos, esplénicos e intraperitoneales el abdomen es blando a la palpación. En pacientes de edad avanzada es frecuente un curso subagudo de los síntomas, que frecuentemente son escasos y prolongados en el tiempo. Determinados antecedentes como la enfermedad de Crohn, la pancreatitis o la patología infecciosa de la vía biliar son factores predisponentes para la formación de abscesos intrabdominales¹¹¹⁻¹¹³
- ii. Infecciones del tracto urinario:** Las infecciones urinarias pueden pasar inadvertidas, sobretodo en mujeres y en pacientes con patología prostática, causando cuadros de fiebre sin focalidad cuando ya han evolucionado a pielonefritis o prostatitis, en varias series se han reportado casos^{34, 111, 113}. Aunque en la mayoría, el diagnóstico se establece mediante las pruebas iniciales como el urocultivo y se confirma mediante ecografía, es importante sospecharlas y tenerlas en cuenta para evitar que se compliquen con bacteriemia y/o abscesos intrabdominales de peor pronóstico para el paciente¹¹⁴.
- iii. Endocarditis infecciosa:** Entre el 2 y el 5% de las endocarditis infecciosas presentan hemocultivos negativos incluso cuando éstos son extraídos adecuadamente, éste

porcentaje aumenta entre aquellos pacientes que han realizado algún tratamiento antibiótico previamente. Los hemocultivos son característicamente negativos en el caso de los siguientes microorganismos por las dificultades en su aislamiento: *Coxiella burnetii* y *Tropheryma whipplei* no cultivables en medios no celulares, *Brucella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Histoplasma*, *Legionella* y *Bartonella* que necesitan medios especiales y *Haemophilus* spp., *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella* que precisan cultivos prolongados¹¹⁵.

Las manifestaciones periféricas son raras en las endocarditis subagudas, por lo que la clínica inicial puede ser indistinguible de la de una fiebre de duración intermedia. La ecocardiografía transesofágica suele ser diagnóstica en el 90% de los casos¹¹⁵

d. Colagenosis y vasculitis

- i. Enfermedad de Still del adulto: El diagnóstico de esta enfermedad inflamatoria se basa en la clínica caracterizada por fiebre diaria, artralgias, mialgias, artritis, odinofagia, linfadenopatías, esplenomegalia, pleuritis y pericarditis. La fiebre puede preceder hasta en un año al resto de los síntomas. La fiebre suele ser elevada y presentar picos una o dos veces al día. En ocasiones puede aparecer un rash macular tenue de predominio troncular que suele coincidir con la fiebre. La enfermedad puede tener un curso continuo o episódico con periodos asintomáticos que pueden durar de semanas a años. Entre los hallazgos más frecuentes en los análisis sanguíneos están la anemia y la leucocitosis. Las transaminasas hepáticas pueden ocasionalmente estar elevadas. En los periodos de actividad de la enfermedad la ferritina suele encontrarse en niveles muy altos. La biopsia ganglionar suele mostrar hiperplasia reactiva y en la biopsia de las lesiones cutáneas se aprecia un infiltrado inflamatorio crónico perivascular. La triada de fiebre elevada, rash tenue

y artritis ó artralgia en un adulto joven es muy sugestivo de enfermedad de Still, especialmente si también se acompaña de odinofagia^{113, 115}

e. Neoplasias

i. Carcinoma de células renales: también conocido como hipernefroma, es una neoplasia que se presenta con frecuencia con astenia intensa y pérdida de peso, pero puede manifestarse hasta en un 15% de los casos como fiebre sin focalidad. El diagnóstico de sospecha se basa en el hallazgo de hematuria microscópica ó eritrocitosis asociada a un aumento en la producción de eritropoyetina. En ocasiones se observa alteración de los parámetros hepáticos en pacientes sin evidencia de metástasis, que generalmente se resuelven tras la extirpación del tumor primario^{113,}

116

ii. Linfoma: La fiebre suele ser una manifestación clínica frecuente en los linfomas avanzados y en aquellos con patrones histológicos más agresivos. Los síntomas B (fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, etc) suelen ser poco frecuentes pero en ocasiones pueden ser la clínica predominante. El hallazgo de linfadenopatías, esplenomegalia, anemia y/ó trombocitopenia no justificadas y la elevación de los niveles de LDH debe hacernos sospechar el diagnóstico^{113, 116, 117}

f. Miscelánea

- i. Tiroiditis subaguda: la tiroiditis se caracteriza clínicamente por la presencia de dolor y sensibilidad tiroidea junto a malestar general, mialgias y fiebre. La presentación suele ser de inicio brusco y en la mitad de los casos va precedida de un cuadro catarral inespecífico. El dolor suele estar frecuentemente referido a la garganta en vez de al cuello y se irradia en ocasiones a la mandíbula o a las orejas. En la mayoría de los casos puede observarse un discreto endurecimiento y aumento de tamaño de la glándula. Las recaídas pueden prolongar el curso la enfermedad a meses. El diagnóstico puede demorarse por escasa sospecha en los casos con mínimo aumento del tiroides y sin dolor local a la palpación¹¹⁸

II.PLANTEAMIENTO

II. PLANTEAMIENTO

La FDI constituye una causa frecuente de enfermedad y de consulta médica en la comunidad, habiéndose definido su concepto por primera vez en la literatura científica por el grupo de investigación en el que se encuadra la autora de este trabajo. Sin embargo, con las actuaciones clínicas de las que disponemos en la actualidad, no se llega a un diagnóstico etiológico en el 20-39% de los casos tras estudio protocolizado y, además, desde la perspectiva cronológica parece estar existiendo un cambio en las etiologías más frecuentes. Por otra parte, carecemos de un conocimiento amplio de las causas de la FDI de las diversas áreas geográficas de una población amplia, como es la de Andalucía, en la que coexisten ámbitos epidemiológicos diferentes, tanto eminentemente urbanos como rurales, que permita validar las propuestas de abordaje clínico de la misma. Por ello, éste pretende describir las características epidemiológicas, etiológicas, clínicas y pronósticas de la FDI en el Sur de Europa y evaluar la rentabilidad de otros métodos no convencionales para mejorar el diagnóstico etiológico.

III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS NULAS

- Las infecciones sistémicas por patógenos especiales no constituyen una causa prevalente de las FDI que actualmente quedan sin diagnóstico etiológico, por lo que no debe incorporarse el estudio de estas etiologías en el abordaje diagnóstico de este síndrome.
- Desde la perspectiva cronológica no se han producido cambios de entidad en las etiologías más frecuentes de la FDI, por lo que las causas conocidas son transportables en el tiempo.
- No existen diferencias significativas en la etiología de la FDI en diferentes áreas de Andalucía, lo que permite generalizar definitivamente el abordaje diagnóstico y terapéutico de la FDI a los ámbitos geográficos estudiados.

2. HIPÓTESIS ALTERNATIVAS

- Las infecciones sistémicas por patógenos especiales son una causa frecuente entre las etiologías de las FDI que actualmente quedan sin diagnóstico, por lo que debe valorarse el estudio de los mismos en el abordaje diagnóstico de este síndrome.
- Desde la perspectiva cronológica se han producido cambios de entidad en las etiologías más frecuentes de la FDI, por lo que el abordaje actualmente debe incorporar estas etiologías en el plan de trabajo y diagnóstico diferencial iniciales.
- Existen ciertas diferencias en la etiología de la FDI en diferentes áreas de Andalucía, que deben tenerse en cuenta a la hora de generalizar definitivamente el abordaje diagnóstico y terapéutico de la FDI a diferentes ámbitos geográficos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto es el análisis prospectivo de las características epidemiológicas, clínicas y etiológicas de los pacientes con FDI atendidos en diferentes hospitales de Andalucía representantes de todas las provincias de ésta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Caracterización epidemiológica y clínica de los pacientes con FDI.
- B. Determinación de la etiología mediante un protocolo de estudio unificado.
- C. Determinación específica centralizada de las posibles etiologías de aquellas FDI sin diagnóstico etiológico tras protocolo unificado. Para ello se realizarán determinaciones serológicas, cultivo de sangre total específico para rickettsias y *B. henselae* mediante técnica de *shell-vial*, e identificación del agente por técnicas de biología molecular tales como reacción en cadena de la polimerasa, RFLPs y secuenciación.
- D. Determinación de la frecuencia de las diferentes etiologías globalmente.
- E. Análisis de las posibles diferencias en las etiologías por las áreas sanitarias de los hospitales participantes.
- F. Análisis descriptivo de la asociación entre la causa de la FDI y las diferentes variables epidemiológicas y clínicas de los pacientes.
- G. Validación del modelo de abordaje diagnóstico y terapéutico propuesto actualmente para la asistencia de la FDI mediante análisis cualitativo.

IV.METODOLOGÍA

1. CENTROS Y PERIODO DE ESTUDIO

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Han participado en el trabajo de campo hospitales pertenecientes a siete provincias de Andalucía:

- Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío (HVR)
 - Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Regional Universitario de Málaga (HRM)
 - Servicio de Medicina Interna, Hospital Torrecárdenas (HTO)
 - Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Jaén (HJA)
 - Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Reina Sofía (HRS)
 - Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Valme (HVA)
 - Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico Virgen de la Victoria (HVV)
 - Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico San Cecilio (HSC)
 - Servicio de Medicina Interna, Hospital Juan Ramón Jiménez (HJR)
- Adicionalmente, ha participado para determinados estudios etiológicos el Programa Asistencial de Enfermedades Infecciosas del Hospital Parc Taulí, de Sabadell, Barcelona.

COMUNIDADES AUTÓNOMAS: Andalucía y Cataluña.

PERÍODO DE ESTUDIO: 1-Noviembre-06 al 1-Noviembre-2009

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN: DEFINICIONES Y CRITERIOS

2.1. Criterios de inclusión

Todos los pacientes adultos (mayores de 14 años) atendidos consecutivamente, durante 12 meses, en las consultas externas de Enfermedades Infecciosas ó de Medicina Interna de los hospitales participantes en el estudio que cumplan los 4 criterios de FDI previamente definidos (11).

- Síndrome febril (definido como una temperatura axilar $\geq 38^{\circ}\text{C}$ en al menos 2 determinaciones en días diferentes) que no se acompaña de ninguna focalidad clínica orientativa.
- De duración entre 7 y 28 días.
- Adquirido en la comunidad (sin antecedentes, por tanto, de estancia hospitalaria) y en un paciente previamente sano (sin antecedentes de inmunodeficiencia, incluyendo la infección por el VIH, u otra enfermedad subyacente crónica que pueda ocasionar la presencia de fiebre ó modular su presentación).
- Que permanece sin orientación diagnóstica tras una evaluación clínica y complementaria básica, que necesariamente debe incluir la realización de una historia clínica y exploración física minuciosas, un hemograma, creatininemia, análisis elemental de orina y una radiografía posteroanterior y lateral de tórax.

2.2 Criterios de exclusión

- Criterios cronológicos de fiebre de adquisición nosocomial o asociada a la asistencia sanitaria, según criterios internacionalmente aceptados.
- Adicción a drogas por vía parenteral (UDVP).
- Infección por el VIH previamente conocida (no se excluye la primoinfección por el VIH).
- Neutropenia de probable origen farmacológico (neutrófilos inferiores a $1000/\mu\text{l}$).

- Neoplasia sólida ó hematológica diagnosticada que no se encuentre en remisión completa (ó que haya recibido tratamiento antineoplásico en el último mes).
- Trasplantados de órgano sólido ó de progenitores hematopoyéticos.
- Portadores de catéteres intravasculares permanentes y/o prótesis endovasculares.
- Enfermedades subyacentes crónicas con afectación potencial del sistema inmunológico (diabetes mellitus con importante repercusión visceral; insuficiencia cardíaca terminal; insuficiencia renal crónica terminal en diálisis peritoneal ó hemodiálisis periódica; hepatopatía crónica en fase de cirrosis; enfermedad inflamatoria intestinal en actividad; enfermedad reumatológica ó hematológica evolucionada).
- Tratamiento farmacológico inmunosupresor.
- Inmigrantes con menos de 1 año de residencia ininterrumpido en nuestro país, ó viajeros internacionales con un viaje reciente (en los 6 meses previos)
- Síndrome mononucleósico (definido como fiebre, faringoamigdalitis, adenopatías mayores de 1 cm de diámetro, hepatoesplenomegalia y linfomonocitosis con >20% de linfocitos atípicos en el examen de sangre periférica).
- No se considerarán criterios de exclusión: alteraciones del sedimento urinario (leucocituria, microhematuria, microproteinuria) sin síntomas miccionales; adenopatías menores de 1cm de diámetro; hepatomegalia y/o esplenomegalia sin una causa evidente, y linfomonocitosis aislada.

3. PROTOCOLO DE ESTUDIO

- Estudio prospectivo de cohortes descriptivo
- Período de inclusión: del 1 de Noviembre del 2006 al 1 de Mayo del 2009 (29 meses)

3.1. Estudio inicial

A todos los pacientes incluidos se les realizó un mínimo de dos visitas (las habituales en la atención clínica en esta patología) en las que se evaluaron variables epidemiológicas, clínicas, biológicas y evolutivas que se detallan en el apartado siguiente (3.1.1). El protocolo de recogida de datos se detalla en el Anexo 1, en el que los datos de los pacientes se incluyeron de forma codificada para preservar la confidencialidad (código numérico del hospital -dos cifras- más código numérico del paciente -tres cifras-). La identidad de los pacientes, una vez codificados, fue custodiada por el investigador principal de cada centro participante.

- **Visita 1:** Se recogieron los datos correspondientes a los apartados 3.1A y 3.1B, se extrajeron las muestras para las determinaciones biológicas estándares y opcionales (apartados 3.1C y 3.1D) y se extrajeron las muestras adicionales, previo consentimiento informado, para la realización de las técnicas microbiológicas centralizadas detalladas en el apartado 3.2 en aquellos pacientes en los que no se llegó a un diagnóstico etiológico tras el estudio convencional:
 - 1 tubo de suero (10 ml) para determinaciones serológicas, que se congeló, previa centrifugación y preparación de 3 alícuotas, a -80°C .
 - 4 tubos de sangre completa: 2 de 5 ml de EDTA y 2 de 5 ml de heparina-litio que se congelaron, sin centrifugar, a -80°C para realización de PCR y cultivo celular (*shell-vial*), respectivamente.

- **Visita 2:** Se realizó a los 14-21 días de la primera, recogiendo en ella los datos evolutivos correspondientes al apartado 3.1E y se extrajeron muestras para las determinaciones biológicas estándares y opcionales evolutivas (apartados 3.1C y 3.1D) y una nueva muestra de suero para la determinación de la posible seroconversión mediante técnicas serológicas centralizadas detalladas en el apartado 3.2 en aquellos pacientes en los que no se llegó a un diagnóstico etiológico tras el estudio convencional:
 - 1 tubo de suero (10 ml) para determinaciones serológicas, que se congeló, previa centrifugación y preparación de 3 alícuotas, a -80°C .

3.1.1 VARIABLES ANALIZADAS.

A. Variables epidemiológicas

1. Edad.
2. Sexo.
3. Lugar de residencia: urbano (>50.000 hab), semiurbano (5000-50000), rural (<5000).
4. Código postal.
5. Profesión/ocupación.
6. Contacto con animales (especificar).
7. Picaduras de insectos (especificar fecha)
8. Viajes a áreas rurales en el último mes.
9. Consumo de lácteos no higienizados.
10. Conductas sexuales de riesgo en el último mes.
11. Otros antecedentes epidemiológicos.
12. Procedencia del paciente (Urgencias / Atención Primaria / Otros).

13. Fecha de la primera evaluación (en el lugar de procedencia del paciente:
Urgencias / Atención Primaria / Otros).
14. Enfermedades subyacentes (en caso de que existan y no constituyan criterio de exclusión, OJO ver página 12)

B. Variables clínicas

15. Fecha de inicio de los síntomas.
16. Patrón de la fiebre (diaria / no diaria).
17. Temperatura máxima termometrada.
18. Tratamiento antimicrobiano empírico previo a la primera consulta.
19. Síntomas acompañantes (ver tabla Anexo 1).
20. Signos acompañantes (ver tabla Anexo 1).
21. Exantema cutáneo (características y fechas de aparición y desaparición).

C. Variables biológicas estándares

- Hematológicas

22. Hemoglobina.
23. Leucocitos totales.
24. Neutrófilos.
25. Linfocitos.
26. Monocitos.
27. Plaquetas.

- Reactantes de fase aguda

28. VSG.
29. PCR.
30. LDH.

- **Parámetros hepáticos**

31. AST/GOT.

32. ALT/GPT.

33. GGT.

34. Fosfatasa alcalina.

35. Bilirrubina total.

36. Bilirrubina directa.

- **Parámetros renales**

37. Creatinina.

38. Sedimento de orina.

- **Bacteriología**

39. Hemocultivos seriados con incubación prolongada (2 tandas con temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$, antes del tratamiento antimicrobiano, siempre que la demora de éste no suponga perjuicio para el paciente).

40. Urocultivo (a ser posible muestra de primera orina de la mañana y antes de tratamiento antimicrobiano, siempre que la demora de éste no suponga perjuicio para el paciente).

- **Estudios serológicos (1ª y 2ª visitas)**

41. *Rickettsia typhi* (IFI IgG [BioMérieux®]) (*)

42. *Rickettsia conorii* ((IFI, IgG [BioMérieux®]) (*)

43. *Coxiella burnetii* (IFI IgG [Vitaltech®]) (*)

44. *Brucella* spp. (IFI IgG: test rápido de Rosa de Bengala, [BioMérieux®] y confirmación por inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de IgG cuantificada, e IgM previa inactivación de IgG y factor reumatoide por Gullisorb (Meridian) [Vitaltech®]) (*)

45. Virus de Epstein-Barr (Quimioluminiscencia (CLIA) para anticuerpos IgG e IgM (DiaSorin), confirmación por IFI (Merifluor®) IgG e IgM) (*)

46. Citomegalovirus (Enzimoimmunoanálisis (ELISA) para anticuerpos IgG e IgM, [Dade Behring]), las IgM positivas se confirmaron por IFI (Meridian) según la técnica descrita previamente para la brucelosis) (*)

47. *Toxoplasma gondii* (IFI IgM) (ELISA para IgG e IgM [Dade Behring], confirmación por IFI de IgG cuantificada (Vitaltech) e IgM (previa inactivación de IgG y factor reumatoide) cuantificada [Vitaltech]) (*)

(*) kits comerciales empleados en el servicio de Microbiología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

- **Infección por el VIH**

48. Carga viral de VIH (a todos los pacientes en la 1ª visita; sólo en los que tuvieron carga viral positiva en la 1ª visita se les repitió nueva determinación junto a serología de VIH (ELISA y Western blot) a las 6 semanas de la primera extracción (ELISA (Dade Behring) y confirmación por Western-Blot (New lav Blot 1, Bio.Rad)

49. Serología de VIH (ELISA y Western blot) (a todos los pacientes en la 1ª visita; sólo en los que tuvieron carga viral positiva en la 1ª visita, se repitió nueva determinación de serología de VIH (ELISA y Western blot) a las 6 semanas de la primera extracción.

D. Variables biológicas opcionales (individualizadas a criterio clínico del médico que atendió al paciente)

50. Baciloscopias y cultivo de micobacterias en orina.

51. Estudio tiroideo (TSH y T4 libre).

52. Estudio inmunológico: autoanticuerpos (ANA, anti-DNA nativo), inmunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA totales, cadenas ligeras kappa y lambda) y complemento sérico.

53. Ecografía abdominal / renal.
54. TAC de tórax y/o abdomen.
55. Gammagrafías (especificar).
56. Ecocardiografía.
57. Otras pruebas de imagen (especificar).
58. Otras pruebas complementarias (especificar y si normal ó orientadora / diagnóstica, agrupadas en:
 - Otras pruebas complementarias (incluyendo invasivas, especificar, máximo 6).
 - Otras serologías (especificar, máximo 6).
59. Motivo de pruebas biológicas opcionales / individualizadas.

E. Variables evolutivas y asistenciales

60. Ingreso hospitalario (si / no).
61. Fecha de ingreso hospitalario.
62. Criterio de ingreso hospitalario (ver Anexo 1).
63. Complicaciones orgánicas (ver Anexo 1).
64. Tratamiento administrado (ver Anexo 1).
65. Fecha de desaparición de la fiebre.
66. Evolución (curación / evolución a FOD / exitus).
67. Diagnóstico final tras estudio convencional protocolizado.

F. Diagnóstico final tras estudios microbiológicos especiales centralizados

68. Diagnóstico final tras estudio microbiológico especializado.
69. Método de diagnóstico microbiológico especializado.
70. Adecuación del tratamiento inicial.

3.1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS CASOS TRAS ESTUDIOS CONVENCIONALES

Tras finalizar el estudio convencional protocolizado de los pacientes en cada uno de los hospitales participantes, cada paciente se asignó a uno de los 3 grupos etiológicos siguientes:

- GRUPO 1: Pacientes con diagnóstico etiológico firme (de etiología infecciosa ó no), los cuales no requerían procesamiento centralizado ulterior de las muestras conservadas, salvo en aquellos pacientes con diagnóstico de infección vírica en los que se realizó:
 - Laboratorio experimental del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla
 - Estudios moleculares (RT-PCR)
 - Carga viral de VEB y CMV (a los pacientes con serología positiva en la primera visita para alguno de estos dos virus) se extrajo inicialmente el ADN viral de 50 µL de sangre completa mediante el método de Affigene DNA Extraction Assay® (Cepheid AB, Bromma, Sweeden), utilizándose como molde para la RT-PCR según el método de Affigene CMV o EBV Trender Diagnostic Assay® (Cepheid AB, Bromma, Sweeden). Para el cálculo de la carga viral se utilizó el software de análisis de Affigene®.
- GRUPO 2: Pacientes con diagnóstico clínico-serológico de rickettsiosis exantemática (fiebre botonosa mediterránea ó tifus murino). En las muestras previamente conservadas de estos pacientes se realizó centralizadamente (Laboratorio de Microbiología de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona) las siguientes técnicas de laboratorio para la caracterización definitiva de la especie de *Rickettsia* responsable (Anexo 2):

- Serologías mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de anticuerpos frente a *R. conorii*, *R. typhi*, *R. felis* y *Rickettsia* Bar 29 (en sueros de fase aguda y convaleciente).
- Cultivo de sangre total en medio celular (monocapas de fibroblastos pulmonares humanos, utilizando la técnica de *shell-vial*) para *Rickettsia* spp.
- Técnicas de biología molecular (PCR, RFLPs y secuenciación, serotipaje, estudio de los perfiles proteicos por SDS-PAGE y de los perfiles antigénicos por inmunoblot).
- GRUPO 3: Pacientes sin diagnóstico etiológico definido (número estimado de 180 pacientes). En las muestras previamente conservadas de estos pacientes se realizó centralizadamente en 2 laboratorios (Laboratorio de Serología del Servicio de Microbiología de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla y el Laboratorio de Microbiología de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona) las siguientes técnicas para profundizar en el diagnóstico etiológico:
 - Laboratorio de Serología del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla (Anexo 2):
 - Serologías frente a los siguientes patógenos (en sueros de fase aguda y convaleciente):
 - Parvovirus B19:
 - Herpes virus humano tipo 6 (HVH-6).
 - *Legionella pneumophila*.
 - *Leishmania* spp.
 - Laboratorio de Microbiología de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona (Anexo 2):
 - Serologías para detección de anticuerpos frente a *R. conorii*, *R. typhi*, *R. felis*, *Rickettsia* Bar 29, *B. henselae*, *Ehrlichia-Anaplasma*

phagocytophilum y *Borrelia hispanica* (en sueros de fase aguda y convaleciente).

- Cultivo de sangre total en medio celular para *Rickettsia* spp. y *B. henselae*.
- Técnicas de biología molecular (PCR, RFLPs y secuenciación, serotipaje, estudio de los perfiles proteicos por SDS-PAGE y de los perfiles antigénicos por inmunoblot) para *Rickettsias* spp., *B. henselae*, *Erlichia*- *A. phagocytophilum* y *B. hispanica*.

La descripción detallada de las diversas técnicas centralizadas de diagnóstico microbiológico está especificada en el Anexo 2.

3.1.3 ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Con los datos obtenidos:

- Se realizó la caracterización epidemiológica y clínica de los pacientes con FDI.
- Se determinó la etiología de los casos de FDI.
- Se confeccionó un mapa de frecuencia de casos por áreas sanitarias/geográficas.
- Se realizó un estudio de factores asociados a una mayor morbilidad (duración total de la fiebre, desarrollo de complicaciones) y mortalidad, analizándose las siguientes variables: edad, sexo, factores de comorbilidad, duración de la fiebre antes de la primera evaluación y fecha de instauración del tratamiento.
- Se realizó un estudio del valor predictivo (S, E, VPP, VPN) de distintas variables epidemiológicas (contacto con animales, picadura de insectos, viajes a áreas rurales, conductas sexuales de riesgo), clínicas (patrón de la fiebre, síntomas y signos clínicos) y analíticos (leucocitos, plaquetas, VSG, PCR, LDH,

transaminasas, colostasis, colostasis disociada, alteración del sedimento urinario...) para los diferentes grupos etiológicos:

- Etiologías infecciosas vs. no infecciosas.
- Etiologías bacterianas vs. etiologías virales.
- Etiología por *Rickettsia* spp. y *C. burnetii* vs. otras etiologías infecciosas.

Para el análisis estadístico se utilizaron proporciones, los test de la Chi cuadrado y el exacto de Fisher, la “t” de Student y la “U” de Mann-Whitney según la distribución de las variables, y los coeficientes de correlación de Spearman y de Pearson. El paquete estadístico utilizado fue el SPSS version 15.0. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

3.1.4 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este estudio se presentó al Comité Ético de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío para su aprobación.

Se solicitó a los pacientes su consentimiento informado a través de formulario.

ANEXO 1

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

CÓDIGO PACIENTE:

I.- VARIABLES DEMOGRAFICAS Y EPIDEMIOLOGICAS.

Sexo: 0 V 0 M **Edad:** (años)

Población: 0 Urbana 0 Semiurbana 0 Rural. **Código postal**

Profesión / Ocupación:

Contacto animales: 0 No 0 Ratas 0 Perros 0 Gatos 0 Aves 0 Ganado:

Picaduras insectos: 0 No 0 Si, garrapatas 0 Si, otros 0 Si, no identificado.

Fecha de picadura: ___ / ___ / ___

Viajes áreas rurales (último mes): 0 No 0 Si Fecha ___ / ___ / ___

Lácteos no higienizados: 0 No 0 Si, leche 0 Si, queso Fecha: ___ / ___ / ___

Conductas sexuales riesgo (último mes): 0 No 0 Si Fecha: ___ / ___ / ___

Otros antecedentes (especificar):

Procedencia: 0 Urgencias 0 Atención Primaria 0 Otros:

Fecha 1ª evaluación ___ / ___ / ___

Enfermedad subyacente 0 No 0 Sí (especificar):

II.- VARIABLES CLINICAS.

Fecha inicio fiebre ___ / ___ / ___

Patrón de la fiebre: 0 Diaria 0 No diaria **Temperatura máxima:** _____ °C

Tratamiento antimicrobiano previo: 0 No 0 Sí

0 Doxiciclina 0 Quinolonas 0 Macrólidos 0 Amoxicilina/clavulánico 0 Cotrimoxazol

0 Cefalosporinas 0 Otro (especificar)

Síntomas	No	Si	Signos	No	Si
Tiritonas			Hepatomegalia		
Cefalea			Esplenomegalia		
Artromialgias			Adenopatías>1cm		
Respiratorios			Inyección conjuntival		
Odinofagia			Faringoamigdalitis		
Nauseas/vómitos			Meningismo		
Diarrea			Alt nivel conciencia		
Ictericia			Exantema		
Urinarios			Mancha negra		
Otros: _____			Otros:- _____		

Exantema: 0 No 0 Macular 0 Papular 0 Maculopapular 0 Petequial

Afectación palmas/plantas: 0 Si 0 No

Fecha aparición: ___ / ___ / ___ Fecha desaparición: ___ / ___ / ___

Analítica	VISITA 1	VISITA 2
	Fecha: ___ / ___ / ___	Fecha: ___ / ___ / ___
Hemoglobina (g/dL)		
Leucocitos		
Neutrófilos		
Linfocitos		
Monocitos		
Plaquetas		
VSG (mm 1º hora)		
PCR (mg/L)		
LDH (UI/L)		
GOT /AST (UI/L)		
GPT / ALT (UI/L)		
GGT (UI/L)		
FA (UI/L)		
Bb total (mg/dL)		
Bb directa (mg/dL)		
Creatinina (mg/dL)		

Leucocituria		
--------------	--	--

III.- VARIABLES ANALITICAS Y COMPLEMENTARIAS.

Hemocultivos: 0 No 0 Si, negativos 0 Sí, positivos

Género y especie: Sensible al antimicrobiano empírico: 0 No 0 Sí

Urocultivo: 0 No 0 Sí, negativos 0 Sí, positivos

Género y especie: Sensible al antimicrobiano empírico: 0 No 0 Sí

Serología (título)	VISITA 1 Fecha: ___ / ___ / ___	VISITA 2 Fecha: ___ / ___ / ___
Rosa Bengala		
<i>Brucella</i> (IFI IgG)		
<i>C. burnetii</i> (IFI IgG)		
<i>R. typhi</i> (IFI IgG)		
<i>R. conorii</i> (IFI)		
VEB IgM		
CMV IgM		
<i>Toxoplasma</i> (IFI IgM)		

Carga viral y serología del VIH (*)

Prueba (título)	VISITA 1 Fecha: ___ / ___ / ___	EXTRACCION 2(*) Fecha: ___ / ___ / ___
Carga viral (copias/mL)		
ELISA / WB	ELISA / WB	ELISA / WB

(*): La carga viral de VIH se solicitará a todos los pacientes en la 1ª visita, y su resultado se consignará como “NEGATIVA” ó, en caso de ser positiva, especificar cuantificación (en número de copias de ARN/mL); en los que tengan carga viral positiva, se realizará una nueva determinación (EXTRACCION 2) junto a una nueva serología de VIH (ELISA y Western blot) a las 6 semanas de la primera extracción.

La serología de VIH (ELISA y Western blot) se solicitará a todos los pacientes en la 1ª visita, y su resultado se consignará como “NEGATIVA”, “POSITIVA” ó “INDETERMINADA”. Sólo en aquellos pacientes que tengan carga viral positiva en la 1ª visita a las se realizará una nueva determinación (EXTRACCION 2) para serología (ELISA y Western blot) a las 6 semanas de la primera extracción.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS OPCIONALES / INDIVIDUALIZADAS.

Baciloscopias-Cultivo micobacterias orina: 0 No 0 Sí, negativos 0 Sí, positivos

Estudio tiroideo: 0 No 0 Sí, normal 0 Sí, alterado (T4 libre / TSH)

Estudio inmunológico 0 No 0 Sí, normal 0 Sí, alterado (especificar)

ECO abd/renal: 0 No 0 Sí, normal 0 Sí, orientadora ó diagnóstica (especificar)

TAC tórax /abdomen: 0 No 0 Sí, normal 0 Sí, orientador ó diagnóstico (especificar)

Gammagrafía: 0 Ósea 0 Tiroidea 0 Leucocitos marcados

0 No 0 Sí, normal 0 Sí, orientadora ó diagnóstica (especificar)

Ecocardiografía: 0 Transtorácica 0 Transesofágica

 0 No 0 Sí, normal 0 Sí, orientadora ó diagnóstica (especificar)

Otras pruebas de imagen: 0 No 0 Sí

 0 Ecografía otra 0 Eco-doppler MMII 0 Otras

Otras pruebas complementarias: 0 No 0 Sí, normal 0 Sí, orientadora ó diagnóstica

Sí	Otras pruebas	Fecha: ___ / ___ / ___	No diagnóstica	Diagnóstica
	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			

Sí	Otras serologías (técnica y título)	VISITA 1 Fecha: ___ / ___ / ___	VISITA 2 Fecha: ___ / ___ / ___
	1		
	2		
	3		
	4		
	5		

	6		
--	---	--	--

Motivo de realización de pruebas opcionales / individualizadas:

Síntoma/signo guía inicial Sospecha epidemiológica Síntoma/signo evolutivo
 No respuesta a tratamiento Otro (especificar)

IV.- VARIABLES EVOLUTIVAS Y ASISTENCIALES.

Ingreso hospitalario: No Sí Fecha ingreso: ___/___/___

Criterio de ingreso hospitalario:

- Imposibilidad de manejo ambulatorio por falta de soporte social adecuado
- Intolerancia digestiva
- Enfermedades subyacentes crónicas de difícil control en presencia de fiebre prolongada
- Afectación grave del estado general
- Existencia de alguno de los siguientes criterios de gravedad:
 - Alteración aguda de funciones superiores
 - Presión arterial sistólica < 90 mm Hg o reducción > 40 mm Hg respecto a la presión arterial basal
 - Signos de hipoperfusión periférica
 - Oligoanuria
 - Signos de insuficiencia respiratoria
 - Signos de coagulopatía
 - Leucocitosis > 15.000/ μ L

Complicaciones orgánicas: 0 No 0 Sí

0 Fracaso renal agudo (sin hemodiálisis).

0 Fracaso renal agudo (con hemodiálisis).

0 Coagulación intravascular diseminada (CID).

0 Menigoencefalitis.

0 Encefalopatía difusa.

0 Insuficiencia respiratoria (sin ventilación invasiva).

0 Insuficiencia respiratoria (con ventilación invasiva).

0 Miopericarditis.

0 Enfermedad tromboembólica.

0 Shock séptico.

0 Fallo multiórganico (FMO).

0 Otras (especificar)

Tratamiento: 0 Exclusivamente sintomático/soporte 0 Antimicrobiano 0 Otros:

Antimicrobiano	Posología	Inicio: ___ / ___ / ___	Final ___ / ___ / ___
1			
2			
3			

4			
---	--	--	--

Fecha desaparición de la fiebre: ___ / ___ / ___

Evolución: 0 Curación 0 FOD (Fiebre>28 días) 0 Exitus

Fecha exitus ___ / ___ / ___ Causa de exitus (especificar)

Diagnóstico final:

0 Diagnóstico etiológico (especificar)

0 No diagnóstico etiológico (con estudio convencional).

0 Autolimitado espontáneamente (sin tratamiento antimicrobiano)

0 Limitado con tratamiento antimicrobiano empírico:

0 Doxiciclina.

0 Otro antimicrobiano (especificar)

V.- PERSONA QUE RELLENA EL PROTOCOLO.

Nombre:

Teléfono de contacto:

FAX:

e-mail

Comentarios:

Fecha y firma:

VI.- APORTACION DE ESTUDIOS ADICIONALES CENTRALIZADOS.

(a rellenar, si procede, por el investigador principal)

0 No diagnóstico etiológico

0 Diagnóstico etiológico

Diagnóstico/s finales:

1.- _____

2.- _____

3.- _____

Método/s de diagnóstico:

1.- _____

2.- _____

3.- _____

Tratamiento apropiado: 0 Si 0 No

Fármaco:

ANEXO 2

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS TÉCNICAS CENTRALIZADAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO UTILIZADOS

1. Laboratorio de Microbiología de la Corporació Sanitària Parc Taulí, Barcelona.
 - Estudios serológicos para detección de anticuerpos frente a *R. conorii*, *R. typhi*, *R. felis* y *Rickettsia* Bar 29, *B. henselae*, *Erlichia-Anaplasma phagocytophilum* y *Borrelia hispanica* (en sueros de fase aguda y convaleciente).
 - Cultivo de sangre total en medio celular (monocapas de fibroblastos pulmonares humanos, utilizando la técnica de *shell-vial*) para *Rickettsia* spp. y *B. henselae*.
 - Técnicas de biología molecular (PCR, RFLPs y secuenciación, serotipaje, estudio de los perfiles proteicos por SDS-PAGE y de los perfiles antigénicos por inmunoblot) para *Rickettsias* spp., *B. henselae*, *Erlichia- A. phagocytophilum* y *B. hispanica*.

2. Laboratorio de Serología del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla:
 - Serologías frente a los siguientes patógenos (en sueros de fase aguda y convaleciente):
 - Parvovirus B19.
 - Herpes virus humano tipo 6 (HVH-6).
 - *Legionella pneumophila*.
 - *Leishmania* spp.

A.- ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE *RICKETTSIA* SPP.

A.1.- Diagnóstico serológico de los casos.

A.1.1. Cultivo de cepas rickettsiales:

Se estudió la reactividad de los sueros de los pacientes frente a los antígenos de las siguientes cepas rickettsiales: *R. conorii*, cepa Malish (agente causal de la FBM, cepa aislada de un paciente por el equipo de Cataluña); *R. typhi* (agente causal del tifus murino, cepa cedida por el laboratorio de referencia de Marsella), *R. felis* (cepa cedida por el laboratorio de referencia de Marsella), y Bar 29 (*Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas, posible patógeno humano, aislada de garrapatas en Cataluña).

Las cepas rickettsiales se cultivaron en monocapas celulares Vero con medio mínimo esencial (MEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal y 2mM L-glutamina. Los cultivos celulares se incubaron a 32°C en el caso de *R. conorii*, *R. typhi* y Bar29, y a 28°C en el caso de *R. felis*. Se controló el crecimiento mediante tinción de Giménez hasta obtener un buen grado de infección.

A.1.2. Obtención de antígeno para serología:

Cuando la capa celular se saturó de *Rickettsia*, se adicionó el doble volumen de agua destilada estéril, dejándose en campana durante 10 minutos. Seguidamente se añadió solución salina vol/vol y se levantó la capa celular con perlas de vidrio. Se centrifugó a 1000 rpm recogiendo el sobrenadante (en el pellet se encontraban las células eucariotas). Éste se centrifugó a 10000rpm y el sedimento (bacterias) se resuspendió en PBS, realizándose un lavado mediante la misma centrifugación. Finalmente, el sedimento se resuspendió en PBS 0.1% de formol. Se realizó una tinción Giménez para comprobar el estado de la muestra y se conservó a -80°C.

A.1.3. Obtención de antígeno para inmunoblot:

Cuando la capa celular se saturó de *Rickettsia*, se levantó mediante perlas de vidrio tal y como se describe en el apartado anterior. La muestra se sonicó 3 veces durante un minuto, esperando 30 segundos entre sonicaciones. Posteriormente, se realizaron las centrifugaciones detalladas en el apartado anterior, utilizando agua estéril en lugar de PBS. Finalmente, se resuspendió la muestra en agua estéril. Se realizó una tinción Giménez y un gel Comassie Blue para comprobar el estado de la muestra. Se conservó a -80°C.

A.1.4. Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Preparación de los portaobjetos: Los antígenos rickettsiales se aplicaron mediante una pluma en los pocillos de portaobjetos. Con el fin de realizar las serologías frente a las distintas cepas de forma paralela, una gota de cada antígeno se colocó en el mismo pocillo, separadas unas de otras. Después de dejar secar, los antígenos se fijaron con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Cribaje: Se depositaron, por duplicado, 20 µl de cada suero de los pacientes diluidos 1/32 en tampón fosfato (PBS) con un 3% de leche descremada. Los sueros se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de dos lavados con PBS-Tween, de 10 minutos cada uno, y un lavado de 5 minutos con agua destilada, los portaobjetos se dejaron secar, se añadió el conjugado (goat anti-human IgG marcada con fluoresceína y diluida en PBS con Azul de Evans) y se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Se repitieron los lavados y después de dejar secar los portaobjetos, se montaron con glicerol y se examinaron en un microscopio de fluorescencia a X400.

Titulación de los sueros positivos: Todos los sueros que presentaron fluorescencia a la dilución de cribaje se volvieron a testar realizando diluciones seriadas dobles a partir de 1/32 con la misma metodología descrita anteriormente. La dilución más alta en la que se distinguió fluorescencia específica se consideró end-point.

Reacciones cruzadas: Se realizó esta técnica utilizando los antígenos de las especies *R. conorii*, *R. typhi*, *R. felis*, y Bar29. En el caso de reacciones cruzadas, se consideró positivo el resultado para aquella especie cuyo título fuera dos veces mayor. Si no era así, se procedió a realizar un inmunoblot para discriminar la reacción específica.

A.1.5. Inmunoblot:

Los antígenos de las cepas que presentaron reacción cruzada se hicieron migrar en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear con TBS 5% de leche descremada toda la noche y lavados con TBS, se incubaron durante 2 horas con el suero sujeto de estudio, diluido en TBS 3% leche descremada. Tras tres lavados con TBS se incubó una hora con el conjugado (goat anti-human IgG marcada con peroxidasa; 1/200 en TBS 3% de leche descremada). Se realizaron tres lavados con TBS y se revelaron. Se consideró positivo si sólo se detectó reacción con un antígeno, en caso contrario se llevó a cabo una cross-absorción.

A.1.6. Cross-absorción:

Se incubaron 3 veces los sueros sujeto de estudio con el antígeno de una de las cepas que hubieron presentado reacción cruzada (absorción). Posteriormente se procedió a realizar la técnica IFI utilizando el antígeno de la otra cepa que presentó reacción cruzada. Si se produjo unión antígeno-anticuerpo durante la absorción, la IFI fue negativa indicando que los anticuerpos detectados eran frente a la primera cepa. En caso contrario, la segunda cepa fue la causante de la infección detectada. Si no se distinguía la especie se consideró serología positiva frente a *Rickettsia* indeterminada.

A.1.7. Criterios diagnósticos de tífus murino:

Detección de un único título de IgG frente a *R. typhi* $\geq 1/512$, o evidencia de seroconversión (aumento del título 4 veces) en dos muestras serológicas extraídas con un período de separación de, al menos, 14 días.

A.2.- Aislamiento y cultivo del microorganismo causal a partir de muestras clínicas procedentes de enfermos.

De cada enfermo se recogieron unos 5 ml de sangre en tubos con heparina para proceder al cultivo del agente rickettsial y unos 5 ml de sangre en EDTA para la PCR. Para el aislamiento de las cepas rickettsiales se utilizó la técnica de centrifugación shell vial (Peter O et al. 1990). Esta técnica consiste en hacer crecer las líneas celulares utilizadas para el cultivo en unos portaobjetos circulares de 1.5 cm. de diámetro colocados en el interior de un tubo y cubiertos por 1ml. de medio de cultivo. Una vez obtenida una buena capa celular, se retiró el medio de cultivo y se añadió la muestra correspondiente. En este caso, se inocularon 0,5 ml de la muestra en tres tubos "shell vial", que contenían monocapas de células Vero y se centrifugaron durante 1 hora a 700 x g. Se decantaron los sobrenadantes y se remplazaron por 1 ml de MEM con un 10% de suero bovino fetal y 2mM L-glutamina. Se incubaron en 5% CO₂, una tubo a 28°C para favorecer el posible crecimiento de *R. felis*, y los otros dos a 32°C, temperatura de crecimiento de las demás cepas estudiadas. Cada cinco días se monitorizó el crecimiento mediante tinción Giménez del sobrenadante. En caso de detectarse presencia de *Rickettsia* se realizó una técnica de inmunofluorescencia en el shell vial positivo, utilizando suero positivo para *R. felis* en el caso del tubo incubado a 28°C, o suero positivo para *R. typhi* y suero positivo para *R. conorii*/Bar29 en cada uno de los tubos incubados a 32°C. En el caso de "shell vials" positivos o dudosos, su sobrenadante así como sus "shell vials" paralelos (de la misma muestra) fueron

utilizados para infectar monocapas de líneas celulares Vero ya en frascos de cultivo celular convencional (a la temperatura en la que se detectó el positivo y en atmósfera de 5% CO₂) hasta que se obtuvo gran cantidad de antígeno (unos 30 frascos de cultivo celular de 150 cm² bien infectados / cepa rickettsial). (Tal y como se indica en apartado A1.1.) Las cepas obtenidas se identificaron mediante técnicas de biología molecular (apartado A.3)

A.3.- Identificación del agente por técnicas de biología molecular (PCR y secuenciación, serotipaje, estudio de los perfiles proteicos por SDS-PAGE y de los perfiles antigénicos por inmunoblot).

A.3.1. PCR:

Se extrajo DNA de las cepas rickettsiales obtenidas en cultivo así como de sangre de los pacientes que, aunque el cultivo hubiera sido negativo, presentaban serología positiva. Para ello se utilizaron columnas de purificación comerciales (QIAmp Tissue Kit y QIAmp Blood kit (QIAGEN)). Se amplificó la secuencia correspondiente al gen 17kDa. Si daba positiva, se amplificaban los genes que codificaban para la citrato sintasa (*gltA*) y las proteínas de membrana rOmpA de 190kDa y rOmpB de 120kDa, según condiciones de la bibliografía. En los casos en los que la PCR fue negativa se realizó una NESTED PCR con primers internos según bibliografía. (Stevenson HL et al. 2005)

A.3.2. Otras técnicas de biología molecular:

En las mismas muestras analizadas por PCR según apartado anterior se aplicaron otras dos técnicas que se han descrito que presentaban mayor sensibilidad: PCR a tiempo real y la reciente técnica de PCR denominada *Linear-after-the-exponential-PCR* (LATE-PCR) (Sánchez et al, 2004; Pierce et al, 2005).

A.3.3.- Secuenciación:

Los fragmentos amplificados se secuenciaron en el Servicio de Microarrays y Secuenciación de DNA, de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas introducidas en el GenBank mediante el programa BLAST, calculándose los porcentajes de homología.

A.3.4.- Serotipaje:

Las cepas se caracterizaron mediante la técnica de referencia ("gold standard") de serotipaje en el laboratorio de referencia de Marsella, confirmando los resultados obtenidos mediante las técnicas de biología molecular. Brevemente, la técnica consiste en obtener antisueros específicos de las cepas aisladas, tras inocularlas en ratones, y enfrentarlos mediante la técnica de inmunofluorescencia a un panel de antígenos de diferentes especies rickettsiales de referencia así como a las cepas problema. Una vez obtenidos los diferentes títulos, se calculan las diferencias de especificidad (SPD):

$$\text{- SPD} = (Aa + Bb) - (Ab + Ba)$$

- Aa, Bb: - \log_2 del título obtenido al enfrentar el suero A (o B) con su antígeno homólogo

- Ab, Ba: - \log_2 del título obtenido al enfrentar el suero A (o B) con su antígeno heterólogo b (o a).

Si la $\text{SPD} < 3$ se asume que las dos cepas pertenecen al mismo serotipo, si la SPD es ≥ 3 los serotipos son diferentes.

A.3.5.- Estudio de los perfiles proteicos:

A.3.5.1.- Purificación de las rickettsias: Para cada cepa se necesitaban unos diez frascos de cultivo (150 cm²) bien infectados. Se recuperaban estas células infectadas, se sonicaban para romper las células eucariotas y liberar las rickettsias y se sometían a un sistema de purificación mediante gradientes de densidad. Inmediatamente después de la sonicación se centrifugaban a 150 x g durante 15 min para separar los restos celulares. Los sobrenadantes se colocarían en PBS con un 25% de sacarosa y se centrifugarán a 7.000 x g durante 30 min. Los pellets así obtenidos se purificaban en un gradiente de densidad de Renografin (del 28% al 45%) y centrifugando a 25.000 rpm durante 1 hora. La banda rickettsial se recuperaba con una jeringuilla y se lavaba con PBS 3 veces a 17.500 x g durante 10 min. cada vez. El pellet se resuspendía finalmente con agua destilada hasta conseguir una concentración proteica de 1 mg/ml. 5 µl de este antígeno purificado se diluía con 5 µl de tampón de Laemli (4% SDS, 10% 2-me, 0,5% azul de bromofenol, 0,125 Tris-HCl, 25% glicerol). Los péptidos se separaban en geles de poliacrilamida con SDS, con un gel apilador al 3,9% de poliacrilamida y un gel separador al 7,5%. Las bandas se visualizaban mediante tinción con azul Coomassie. El tamaño de las bandas obtenidas se estimó con un marcador de pesos moleculares (Bio-Rad).

A.3.5.2.- Inmunoblot: En paralelo se hizo migrar otro gel SDS-Page que se utilizó para el inmunoblot. Las proteínas de estos geles se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los lugares no ocupados fueron bloqueados con TBS (10mM Tris-HCl, 250mM NaCl, 0,01% mertiolato) con un 5% de leche descremada, dejándolos en incubación durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados de 10 min cada uno en TBS, se incubó el suero policlonal específico para cada cepa obtenido en Marsella, a una dilución 1/100 en TBS-3% de leche descremada y se incubó en agitación durante 2h a temperatura ambiente. Los anticuerpos reactivos se detectaron con una anti-globulina de ratón marcada con peroxidasa a una dilución 1/200 en TBS-3% leche descremada. Seguidamente se realizaron tres lavados de 10 min cada uno en TBS y

se detectó la reacción con una solución que contenía 0,015% 4-cloro-1-naftol, 0,015% peróxido de hidrógeno, y 16% metanol en PBS. En cuanto aparecieron las bandas la reacción se paró con agua destilada

B.- ESTUDIO DE *BARTONELLA* SPP.

B.1.- Diagnóstico serológico de los casos.

Para el estudio de inmunofluorescencia se utilizó el kit comercial Focus Technologies (Bartonella IFA IgG, Focus technologies, Inc. USA) según recomendaciones del fabricante.

B.2.- Aislamiento y cultivo del microorganismo causal a partir de muestras clínicas procedentes de enfermos.

En aquellas muestras positivas en el diagnóstico serológico, se procedió al aislamiento y cultivo del microorganismo. Las muestras de sangre recogidas en tubos de EDTA se congelaron a -80°C, durante un periodo mínimo de 15 días con el fin de favorecer la hemólisis.

Posteriormente se descongelaron y se cultivaron inmediatamente en 3 placas de agar Columbia enriquecido con 5% sangre de cordero (bioMérieux). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 45 días, siendo supervisados diariamente. La identificación de las colonias a nivel de género se llevó a cabo mediante tinción Gram. También se realizó la identificación de estas cepas a nivel de especie mediante técnicas de biología molecular.

B.3.- Identificación del agente por técnicas de biología molecular.

Se realizó la identificación del agente etiológico por técnicas moleculares en las cepas obtenidas en los cultivos. Del mismo modo, se llevaron a cabo dichas técnicas en

muestras de sangre EDTA de aquellos pacientes con serología positiva y cultivo negativo. Para el diagnóstico por biología molecular se realizó extracción de DNA de las cepas utilizando el kit QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. El DNA de las muestras de sangre se obtuvo mediante el kit QIAmp DNA blood mini kit (QIAGEN Inc, GMBH, Germany) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para la región intergénica 16S-23S rRNA. Los fragmentos amplificados se visualizaron tras migración en geles de agarosa al 3%, tinción con bromuro de etidio y visualización en transiluminador UV. Con estos iniciadores específicos para el género *Bartonella*, se consiguen fragmentos de diferentes tamaños según la especie. Para la identificación definitiva de la especie, se secuenció el material genético en el Servicio de Microarrays y Secuenciación de DNA, de la Universidad Autónoma de Barcelona. (Apartado A.3.3)

C.- ESTUDIO DE *BORRELIA HISPANICA* Y *ERLICHIA* – *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*

C.1.- Diagnóstico serológico de los casos.

Borrelia hispanica:

En colaboración con el Centro Nacional de Microbiología se llevó a cabo el ensayo de inmunofluorescencia indirecta según descripción en apartado A.1.4.

Erlichia – *Anaplasma phagocytophilum*:

Para el estudio de inmunofluorescencia se utilizó el kit comercial Focus Technologies (*Anaplasma phagocytophilum* IFA IgG, Focus technologies, Inc. USA) según recomendaciones del fabricante.

C.2.- Identificación del agente por técnicas de biología molecular.

Se realizó la identificación del agente etiológico en muestras de sangre EDTA. Se realizó extracción de DNA de las muestras de sangre mediante el kit QIAmp DNA blood mini kit (QIAGEN Inc, GMBH, Germany) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Borrelia hispanica:

Se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de una parte del gen que codifica para la flagelina de *Borrelia* spp. Este gen codifica para la proteína endoflagelar típica de espiroquetas y cuya diversidad permite distinguir el género *Borrelia*. Se utilizaron los iniciadores C y D localizados en las posiciones 280-299 y 844-863 del gen, respectivamente. Estos iniciadores son específicos de género. Las condiciones de la reacción fueron las indicadas en la bibliografía (Fukunaga et al. 1996) El producto de amplificación se visualizó en geles de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio. Con el fin de identificar la especie, se procedió a la secuenciación de los fragmentos obtenidos tal y como se ha indicado en apartados anteriores.

Erlichia – Anaplasma phagocytophilum:

En aquellos pacientes con serología positiva o dudosa se procedió a realizar la identificación por técnicas de biología molecular. Para ello se llevó a cabo una heminested PCR según condiciones descritas en la bibliografía (Alberti et al. 2005). Se realizó una primera amplificación de una parte de la proteína de choque térmico *groEL* con los iniciadores EphplgroEL(569)F y EphplgroEL(1193)R obteniendo un fragmento de 624pb. Mediante la PCR heminested específica de especie con los iniciadores EphplgroEL(569)F y EphplgroEL(1142)R se obtuvo un fragmento de 573pb que se secuenció tal y como se ha indicado en apartados anteriores.

D.- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *LEISHMANIA* SPP.

Se determinó la presencia de IgG e IgM por inmunofluorescencia indirecta (IFI) frente a *Leishmania*, en sueros de fase aguda y fase convaleciente que se estudiaron

simultáneamente. La detección de IgG se estudió en diluciones 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 y la de IgM en diluciones 1:8, 1:16 y 1:32, previa inactivación con GullSORB de las IgG y factor reumatoide.

En caso de ser positivos los sueros estudiados, tanto IgG como IgM, a diluciones iguales ó superiores a las indicadas se repitieron las determinaciones con nuevas diluciones, hasta la última dilución que muestre fluorescencia.

D.1.- Criterios diagnósticos de leishmaniasis.

- Detección de IgG \geq 1:32 con presencia de IgM.
- Evidencia de seroconversión (aumento del título cuatro veces).

E.- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE PARVOVIRUS B19.

Se estudió la detección de anticuerpos IgM frente al parvovirus B19 mediante dos técnicas serológicas:

- EIA con antígeno recombinante de parvovirus B19. Los sueros fueron considerados como positivos ó negativos de acuerdo con los testigos positivo, negativo y corte de la técnica.
- Mediante inmunofluorescencia indirecta se estudiaron los sueros en portaobjetos de cristal con antígeno de parvovirus B19.

Los sueros eran inactivados frente a IgG y factor reumatoide con reactivo de GullSORB. Se utilizaron diluciones 1:16 y 1:32 del suero problema. En caso de ser positivos los sueros estudiados a diluciones iguales ó superiores a las indicadas se repetían las determinaciones con nuevas diluciones, hasta la última dilución que mostrara fluorescencia.

E.1.- Criterio diagnóstico de infección por parvovirus B19.

- Detección de anticuerpos IgM \geq 1:16.

F.- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE INFECCIÓN POR *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Se determinaron los anticuerpos totales (IgG+IgA+IgM) frente a *Legionella pneumophila* serogrupos 1-6 mediante IFI, en un *screening* inicial. Aquellos sueros que resultaban reactivos fueron estudiados frente a cada uno de los seis serogrupos.

La presencia de anticuerpos específicos se estudió en diluciones 1:16, 1:32 y 1:64 del suero problema y los que resultaban positivos se estudiaban frente a los serogrupos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 hasta la última dilución que resultaba positiva, utilizando para ello controles positivos y negativos en todos los casos.

F.1.- Criterios diagnósticos de infección por *Legionella pneumophila*.

- Detección de título único \geq 1/256.
- Evidencia de seroconversión (aumento del título cuatro veces).

G.- DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE HERPES VIRUS HUMANO TIPO 6.

Estudiamos anticuerpos IgG frente al herpesvirus 6 por técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) y de IFI. Para técnica de ELISA se utilizaron micropocillos recubiertos de antígenos del virus herpes humano 6, y para la IFI portaobjetos de vidrio con los mismos antígenos.

G.1.- Criterios diagnósticos de infección por herpes virus humano tipo 6.

- Detección de título único \geq 1:512.
- Detección de seroconversión \geq 1/128.

V.RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Población

Se incluyeron un total de 393 pacientes entre los 9 centros participantes, de los cuales fueron excluidos 60 (15,2%): por pérdida de seguimiento (31 pacientes) o por considerarse que no cumplían criterios de FDI (29 pacientes). Se analizaron 333 pacientes cuya distribución geográfica según hospitales de referencia se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Hospitales participantes y número de casos incluidos.

Hospital	Incluidos	Excluidos
Virgen Rocio- Sevilla	190	30
Virgen Victoria-Málaga	24	4
Reina Sofia- Córdoba	36	4
Valme - Sevilla	74	10
Clínico - Granada	11	1
Torrecárdenas-Almería	7	0
Regional Universitario – Málaga	27	6
JR Jiménez - Huelva	7	1
Hospital de Jaén	17	8
Total	393	60

2. Características demográficas

De los 333 pacientes analizados, la mayoría fueron varones (222, 66,7%), con una edad mediana de 35 años. Procedían de áreas rurales tan sólo un 6% del total, el resto vivían habitualmente en áreas urbanas o semiurbanas. La actividad profesional de los pacientes fue variada, encontrándose la mayoría en el sector de la construcción (20,7%) y en trabajos relacionados con actividad de oficina (18,9%), tan sólo un 7,8% del total se dedicaban profesionalmente a la agricultura o ganadería.(Tabla 2)

Tabla 2. Variables demográficas

Variables demográficas	N=333
Sexo H/M	222(66,7%)/111(33,3%)
Edad	35 (15-79)
Procedencia	
Área Urbana (>50 mil habitantes)	197 (57,2%)
Área Semiurbana (5-50 mil habitantes)	114 (34,2%)
Área rural (< 5 mil habitantes)	22 (6%)
Profesiones	
Construcción	69 (20,7%)
Oficina	63 (18,9%)
Comercio	53 (15,9%)
Ama de casa	43 (12,9%)
Estudiantes	28 (8,40%)
Agricultura-ganadería	26 (7,8%)
Jubilados	10 (3%)
Otros	41 (12,3%)

3. Características epidemiológicas

Entre las variables analizadas, la más frecuente resultó ser el contacto con animales, referido por el 48,6% de la muestra, mayoritariamente perros (35,4%). El resto de antecedentes fueron poco frecuentes, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Variables epidemiológicas

Variables epidemiológicas	N=333
Contacto con animales	
No	171 (51,4%)
Sí	162 (48,6%)
Perros	118 (35,4%)
Aves	19 (5,7%)
Ganado	13 (3,9%)
Gatos	10 (3%)
Picaduras de insecto	9 (2,7%) (4 garrapatas,5 no identificados)
Contacto con áreas rurales (mes previo)	56 (16,8%)
Consumo de lácteos no higienizados	10 (3%)
Contactos sexuales de riesgo	5 (1,5%)

4. Características clínicas y asistenciales

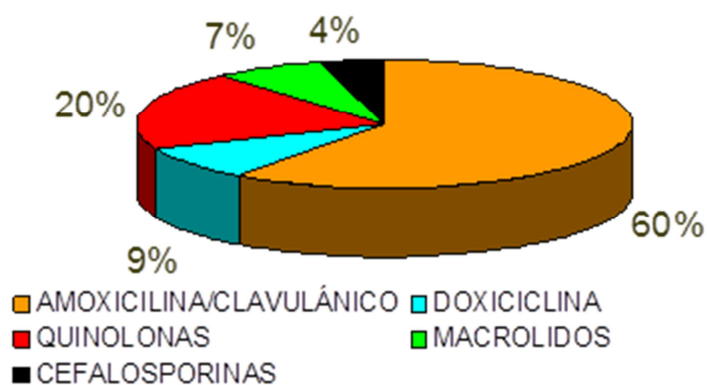
La mayoría de los pacientes fueron derivados al servicio de Enfermedades Infecciosas de los distintos hospitales participantes desde el área de urgencias (91,9%). La fiebre desde el inicio hasta el día de la primera visita tuvo una duración media de 15,7 días. (tabla 4).

En el momento de la primera visita, ya habían recibido tratamiento antimicrobiano empírico 150 pacientes (45%). El tipo de tratamiento se puede ver en la Figura 3.

Tabla 4. Variables asistenciales

Variables asistenciales	N=333
Procedencia del paciente	
Urgencias	306 (91,9%)
Atención Primaria	9 (2,7%)
Otros	18 (5,4%)
Días de fiebre (Inicio-primera visita)	15 (7-24) días
Antibiótico previo	150 (45%)

Figura 3. Tipo de tratamiento antibiótico previo.



Cómo se puede observar en esta figura, el 60% de los pacientes que recibieron tratamiento empírico lo hicieron con amoxicilina-clavulánico (87 pacientes, 60%).

Analizando las características clínicas de los pacientes, en la mayoría de los casos la fiebre tuvo un patrón diario (311 pacientes, 93,4% de los casos), con una media de

temperatura máxima de $39,1 \pm 0,64$ °C. La duración media hasta su desaparición fue de $20,9 \pm 8,9$ días. Los síntomas y signos más frecuentes se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Síntomas y signos más frecuentes

Síntomas: N pacientes (%)	Signos: N pacientes (%)
Artromialgias 182 (57,4%)	Exantema 33 (9,9%)
Cefalea 180 (54,1%)	Hepatomegalia 31 (9,3%)
Tiritonas 170 (51,1%)	Adenopatías 17 (5%)
Respiratorios 51 (15,3%)	Esplenomegalia 16 (4,8%)
Nauseas/Vómitos 52 (15,6%)	Faringoamigdalitis 8 (2,4%)
Odinofagia 28 (8,4%)	Inyección conjuntival 6 (1,8%)
Diarrea 26 (7,8%)	Meningismo 1
Miccionales 16 (4,8%)	
Ictericia 4 (1,2%)	

5. Alteraciones analíticas más frecuentes

Las alteraciones analíticas observadas con más frecuencia fueron la elevación de las transaminasas, sobretudo la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) que se encontraba por encima de 50 UI/L en el 44% de los pacientes, la elevación de la Lactato deshidrogenasa (LDH) por encima de 500 UI/L (38,7% de los pacientes) y la neutropenia y linfopenia observada en el 24 y el 27% de los pacientes respectivamente.

En la tabla 6 se representan todas las variables analíticas realizadas con sus valores de mediana y rango en todos los pacientes, así como la estratificación por valores patológicos y su frecuencia de aparición.

Tabla 6. Variables biológicas analizadas

Variable	M	(Rango)		N(%)
VSG (mm/h)	31	1-120	<30 mm/h	154 (46%)
PCR (mg/L)	20,6	0,1-416	<20 mg/dL	153 (46%)
LDH (UI/L)	437	4-3730	> 500 UI/L	125(38,7%)
Cr (mg/dL)	0,8	0,4 – 2,7	> 1,1 mg/dL	27(8,4%)
Leucocituria				46/284(16%)
GOT/AST (UI/L)	44	6-1781	> 50 UI/L	142 (44%)
			> 150 UI/L	42 (12,6%)
GPT/ALT (UI/L)	74	8-1419	> 50 UI/L	197 (61%)
			> 150 UI/L	79 (23,7%)
GGT (UI/L)	73	6-1369	> 50 UI/L	208 (64%)
			> 150 UI/L	98 (29,4%)
FA (UI/L)	150	20-1796	> 300 UI/L	56 (17,3%)
Bb total (mg/dL)	0,56	0,1-15,4	> 1,2mg/dL	4 (1,2%)
Hb (g/dL)	13,4	7,1-17	< 12 g/dL	56(17%)
			> 15 g/dL	52 (16%)
Leucocitos	7.395	1.800-34.000	> 10.000	81 (25%)
			< 4.000	21 (6,5%)
Neutrófilos	3625	200-30840	>7.500	42 (13%)
			< 2.500	77 (24%)
Linfocitos	2000	410-21200	> 4.000	59 (18%)
			< 1.500	88 (27%)
Monocitos	600	1-3900	> 800	89 (27%)
Plaquetas	242000	118-727000	> 450.000	26 (8%)
			< 100.000	8(2,4%)

6. Aislamientos microbiológicos

Se realizaron hemocultivos en 203 de los 333 pacientes (62,8%). En 9 de los 203 se aislaron microorganismos (4,43%): *Brucella melitensis* 5; *Klebsiella pneumoniae*; *Neisseria meningitidis*; *Staphylococcus aureus* meticilín-sensible y *Staphylococcus constellatus*.

Se realizaron urocultivos en 298 pacientes (92,2%), de los cuales fueron positivos 15 (5%): *Escherichia coli* 5; *Klebsiella pneumoniae* 3; *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus* y *Streptococcus* spp.

7. Otras pruebas complementarias

Ecografía abdominal: solicitada en 92 pacientes (27,6%). Orientadora en 23 casos (25%)

Tomografía axial computerizada (TAC): Se solicitó en 32 casos (9,6%). Orientadora en 17 (50%).

8. Tratamiento y evolución

Se decidió iniciar tratamiento antimicrobiano en el primer día de consulta en 192 pacientes (57,6%). El antibiótico más utilizado fue doxiciclina acompañada o no de otros fármacos (162 pacientes, 48,6%), principalmente quinolonas y amoxicilina-clavulánico. Se utilizó también como tratamiento empírico: amoxicilina-clavulánico y quinolonas (15 y 9 pacientes respectivamente). 141 pacientes (42,3%) recibieron tratamiento sintomático (Tabla 7)

Tabla 7. Tratamiento inicial

Tratamiento	N(%)
Doxiciclina total	162 (48,64%)
Doxiciclina sola	137 (41,14%)
Doxiciclina + otro	25 (7,5%)
Cefalosporina	4 (1,2%)
Amoxiciclina-clavulánico	13 (3,9%)
Quinolonas	8 (2,4%)
(Levofloxacino,Ciprofloxacino)	
Amoxicilina-clavulánico	15 (4,5%)
Quinolonas	9 (2,7%)
Cefalosporinas	4 (1,2%)
Otros	2 (0,6%)
Tratamiento sintomático	141 (42,34%)

La fiebre tardó una media de $5,3 \pm 13$ días en desaparecer (mediana de 3 días) desde el día del inicio de tratamiento en consulta especializada, ya fuera éste sintomático ó con antimicrobianos.

La mayoría de los pacientes no precisaron ingreso hospitalario. De los 50 (15,5%) pacientes que requirieron ingreso: 20 ingresaron por fiebre persistente, 5 por afectación grave del estado general, 3 pacientes por intolerancia digestiva, 3 presentaron complicaciones orgánicas, 1 fallo multiorgánico, 1 fracaso renal agudo, 1 enfermedad tromboembólica y 16 casos en los que no se justificó el ingreso.

De los 333 pacientes, 296 se curaron sin secuelas (91,6%), 23 pacientes evolucionaron a FOD (7,1%) (13 pacientes sin diagnóstico, 4 casos de infección por CMV y/ó VEB, 3 infecciones localizadas, 1 caso de colagenosis, 1 TBC y una miscelánea de infecciones por otros patógenos) y 3 pacientes fallecieron (1 paciente

con leishmaniasis visceral, 1 paciente con neoplasia vesical y endocarditis nosocomial y 1 paciente con linfoma).

9. Diagnóstico inicial tras estudio convencional

Se alcanzó un diagnóstico etiológico tras el estudio inicial en 214 pacientes (64,2%). En 119 (35,7%) no fue posible realizar un diagnóstico con los estudios convencionales y la fiebre se autolimitó (69 pacientes, 21%) ó se limitó tras tratamiento con doxiciclina (50 pacientes,15%).

La etiología más frecuente fue la infección vírica (106 pacientes, 31,8%). El virus más frecuente fue el Citomegalovirus (CMV) en 60 pacientes (18%) seguido del virus de Epstein-Barr (VEB) en 28 casos (8,4%).En 6 pacientes el virus del VIH fue el causante de la fiebre y 3 pacientes se diagnosticaron de infección por PVB19. Un total de 61 pacientes (18,3%) presentaron una serología compatible con infección aguda por Fiebre Q (48 pacientes,14,4%) ó Rickettsias (*R. typhi* 8 (2,4%), *R. conorii* 5 (2,4%)).Hubo 8 casos de Brucelosis aguda (2,4%) y 10 (3%) de infecciones localizadas. En 8 casos se diagnosticaron otras infecciones: 2 casos de bacteriemia primaria (*SAMS* y *Klebsiella pneumoniae*); una TBC diseminada; 1 Yersiniosis; 1 Toxoplasmosis; 1 Leishmaniasis; 1 Endocarditis y 1 meningococcemia sin meningitis).

Entre las causas no infecciosas (21 casos, 6,3%), se diagnosticaron 9 (2,7%) colagenosis-vasculitis: 2 arteritis de la temporal; Enfermedad de Still; Enfermedad de Wegener; lupus cutáneo; polimialgia reumática; sarcoidosis y 2 vasculitis no especificadas) 7 tiroiditis subagudas (2,1%), 3 neoplasias (adenocarcinoma renal, neoplasia vesical y linfoma) y por último una pericarditis idiopática y un pseudotumor inflamatorio.

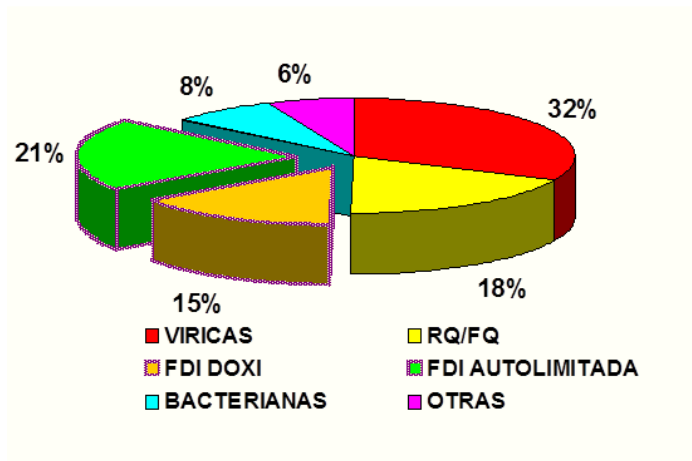
Las diferentes etiologías se muestran detalladas y según grupo etiológico en la tabla 6 y en la figura 4.

Tabla 8. Etiologías de la fiebre de duración intermedia tras estudio inicial

Etiologías	N(%)
Virus	106(31,8%)
CMV	60 (18%)
VEB	28 (8,4%)
CMV/VEB*	9 (2,7%)
VIH	6 (1,8%)
PVB19	3 (0,9%)
Fiebre Q/Rickettsias	61 (18,3%)
Fiebre Q	48 (14,4%)
Fiebre botonosa	5 (1,5%)
Tifus murino	8 (2,4%)
Brucelosis	8 (2,4%)
Infecciones localizadas	10 (3%)
Pielonefritis aguda	6 (1,8%)
Abscesos intraabdominales	4 (1,2%)
Otras infecciones	8 (2,4%)
Colagenosis	9 (2,7%)
Tiroiditis subaguda	7 (2,1%)
Neoplasias	3 (0,9%)
Otras	2 (0,6%)
N	214 (64,2%)

*VEB/CMV: pacientes con positividad a ambos virus en pruebas serológicas.

Figura 4. Distribución de grupos etiológicos



*FDI DOXI: Fiebre limitada con doxiciclina; RQ/FQ: Rickettsiosis ó Fiebre Q

10. Realización de estudios centralizados

Se realizaron estudios centralizados en 208 pacientes (62,4% del total). Se enviaron 14 muestras para estudio exclusivamente al laboratorio de microbiología de la corporació sanitaria Parc Taulí en Sabadell, 45 muestras para estudios centralizados de virus en el laboratorio experimental del servicio de Enfermedades Infecciosas del hospital Virgen del Rocío y 149 muestras se enviaron al laboratorio de serología del Hospital Virgen del Rocío y al Parc Taulí.

En 72 casos, no fue posible realizar estudios centralizados a pesar de cumplir los criterios, por problemas con la conservación o el transporte de las muestras.

Estudios centralizados por grupo etiológico

De los 106 pacientes diagnosticados de viriasis tras el estudio inicial se analizaron en estudios centralizados 73 (68,8%).

De los 61 pacientes clasificados como zoonosis tras el estudio inicial se analizaron en estudios centralizados 29 (47,5%).

De los 119 pacientes sin diagnóstico tras el estudio inicial se analizaron en estudios centralizados 106 (89%)

11. Diagnóstico final tras estudios centralizados

En el grupo de viriasis, tras analizar las 73 muestras enviadas con las diferentes pruebas serológicas y moleculares protocolizadas, 59 pacientes mantuvieron el mismo diagnóstico y 14 se reclasificaron en distintas etiologías: 10 pacientes se diagnosticaron de otro virus diferente (5 casos de coinfección CMV y VEB, 1 PVB19, 1VHH6, 2 VEB y 1 CMV), 3 pacientes se diagnosticaron de zoonosis (2 *Bartonella henselae* y 1 *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas (SFGR) (sin poder especificarse especie) y en 1 paciente no pudo confirmarse ningún diagnóstico.

En el grupo de las 29 zoonosis enviadas a estudios centralizados, 13 casos (44,8%) se confirmaron con el mismo diagnóstico (1 cultivo positivo para *R. typhi*) y 16 casos (55,1%) se reclasificaron con un diagnóstico diferente: 6 casos de nuevas zoonosis (3 *Bartonella henselae*; 1 *R. typhi*; 1 *R. felis* y 1 SFGR), en 5 casos se diagnosticaron viriasis (4 VEB y 1 VHH6) y no se pudo confirmar ningún diagnóstico en 5 casos.

En el grupo de los pacientes sin diagnóstico tras el estudio inicial, de las 106 muestras analizadas, 81 (76,4%) permanecieron sin diagnóstico tras el estudio centralizado. 20 pacientes se diagnosticaron de zoonosis (13 *Bartonella*, 3 *Anaplasma*, 2 *R. felis*, 1 *R. typhi* y 1 *R. conorii*) y 5 pacientes se diagnosticaron de viriasis (4 VHH6 y 1 PVB19).(tablas 9 y 10)

Tabla 9. Resultados de estudios centralizados

Diagnóstico inicial	Diagnóstico tras estudio centralizado
<u>No diagnóstico</u>	ND: 81/106 (76,4%)
Centralizados 106/119 (89%)	Zoonosis: 20/106 (19%) 13 <i>Bartonella</i> ; 3 <i>Anaplasma</i> ; 2 <i>R. felis</i> ; 1 <i>R. typhi</i> ; 1 <i>R. conorii</i>
	Virus: 5/106 (4,7%) 4 VHH6; 1 PVB19
<u>Virus</u>	No confirmado: 1
Centralizados 73/106 (68,8%)	Zoonosis: 3/73 (4,1%) 2 <i>Bartonella</i> ; 1 SFGR
	Otro virus 10/73 (13,6%), 1 caso nuevo de coinfección CMV + VEB; 1 PVB19; 1 VHH6; 1 VEB y 6 CMV.
	59/73 casos (81%) confirman diagnóstico
<u>Zoonosis</u>	No confirmado: 5/29 (17%)
Centralizados 29/61 (47,5%)	Virus: 3/29 (17%) 2 VEB y 1 VHH6
	Otra zoonosis: 6/29 (20,6%) 3 <i>Bartonella</i> ; 1 <i>R. felis</i> ; 1 <i>R. typhi</i> ; 1 SFGR.
	14/29 casos (48%) confirmados (1 caso de <i>R. typhi</i> confirmado con cultivo +)

Tabla 10. Diagnósticos nuevos tras estudios centralizados

Diagnóstico nuevo	Número de casos (N=49)
<i>Bartonella henselae</i>	18
<i>Anaplasma phagocytophylum</i>	3
<i>R. felis</i>	3
<i>R. typhi</i>	2
<i>R. conorii</i>	1
“Spotted fever group <i>Rickettsia</i> ” (SFGR)	2
VHH6	6
VEB	4
CMV	3
VEB y CMV	5
PVB19	2

En 72 pacientes de 102 con diagnóstico previo de zoonosis o viriasis se confirmó el mismo diagnóstico (70,5%). Sin embargo, en los otros 30 pacientes (29,5%) se confirmó un diagnóstico distinto (tabla 10).

En el grupo de pacientes sin diagnóstico, se realizaron centralizados en 43 de los 50 pacientes en los que habían recibido doxiciclina, de los cuales se diagnosticaron 7 (7/43, 16,2%) y en 62 pacientes de los 69 en los que la fiebre se autolimitó sin tratamiento, diagnosticándose en este último grupo a 17 pacientes (17/62, 27,4%). (Tabla 11)

Tabla 11. Resultados de estudios centralizados en pacientes sin diagnóstico previo

No diagnóstico con Doxiciclina*	No diagnóstico
Realizados 43/50 (86%)	Realizados 62/69 (90%)
<u>Diagnósticos 7/43 (16,2%)</u>	<u>Diagnósticos 17/62 (27,4%)</u>
<i>Bartonella</i> 3 casos	<i>Bartonella</i> 9 casos
VHH6 2 casos	<i>Anaplasma</i> 3 casos
<i>R. felis</i> 1 caso	VHH6 2 casos
PVB19 1 caso	<i>R. typhi</i> 1 caso
	<i>R. conorii</i> 1 caso
	<i>R. felis</i> 1 caso
Sin diagnóstico 36 (83,7%)	Sin diagnóstico 45 (72,5%)
N total =50	N total =69

*Pacientes sin diagnóstico que recibieron tratamiento con Doxiciclina.

Las etiologías finales tras los estudios centralizados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Etiologías finales tras estudios centralizados

Etiologías finales tras centralizados	N(%)
Virus	111(33,3%)
CMV	62 (18,6%)
VEB	24 (7,2%)
CMV/VEB*	9 (2,7%)
VIH	6 (1,8%)
PVB19	4 (1,2%)
VHH6	6 (1,8%)
Fiebre Q/Rickettsias	60 (18%)
Fiebre Q	44 (13,2%)
Tifus murino	10 (3%)
Fiebre botonosa	1 (0,3%)
<i>R. felis</i>	3 (0,9%)
SFGR	2 (0,6%)
<i>Anaplasma phagocythophylum</i>	3 (0,9%)
<i>Bartonella henselae</i>	18 (5,4%)
Brucelosis	8 (2,4%)
Infecciones localizadas	10 (3%)
Pielonefritis aguda	6 (1,8%)
Abscesos intraabdominales	4 (1,2%)
Otras infecciones	8 (2,4%)
Colagenosis	9 (2,7%)
Tiroiditis subaguda	7 (2,1%)
Neoplasias	3 (0,9%)
Otras	2 (0,6%)
N	239 (71,7%)

12. Rentabilidad diagnóstica del protocolo

El número de pacientes sin diagnóstico se redujo un 7,5% tras los estudios centralizados: de 119 (35,7%) a 94 (28,2%) (13 casos no enviados y 81 sin diagnóstico a pesar de estudio centralizado)

13. Variables asociadas a grupos etiológicos finales

Los diagnósticos se agruparon por etiologías más frecuentes, analizándose en un primer paso de forma independiente a excepción del grupo de *R. typhi*, *R. conorii*, *R. felis* y SFGR que se analizaron en conjunto también en el primer análisis y en un segundo paso fueron incluidas en el grupo de patologías tratables con doxiciclina junto a *C.burnetii*, *B.henselae* y *Anaplasma* spp. para compararlas con el grupo de CMV y VEB.

14. Distribución geográfica de los casos

Al estudiar la distribución de las diferentes etiologías por área geográfica no se observaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 13)

Tabla 13. Distribución geográfica de las diferentes etiologías

Etiología	Andalucía oriental	Occidental	N (diagnósticos)
<i>Anaplasma</i>	1 (1,4%)	2 (0,8%)	3
<i>Bartonella</i>	3(4%)	15 (5,7%)	18
<i>Brucella</i>	2 (2,8%)	6 (2,2%)	8
Fiebre Q	10 (14%)	34 (13%)	44
<i>R. typhi</i>	0	10 (4%)	10
<i>R. conorii</i>	0	1 (0,3%)	1
<i>R. felis</i>	2 (2,8%)	1 (0,3%)	3
SFGR	0	2 (0,8%)	2
CMV	18 (25,3%)	44 (16,7%)	62
VEB	6 (8,4%)	18 (6,8%)	24
ND	18 (25,3%)	76 (29%)	94
Total incluidos*	71 (21,3%)	262 (78,6%)	333 (total)

Las diferencias de casos por áreas geográficas no fueron estadísticamente significativas.

15. Análisis univariante de variables asociadas a etiologías más frecuentes

Se analizaron todas las variables demográficas, clínicas y analíticas recogidas entre los pacientes diagnosticados de CMV, VEB, Fiebre Q y Rickettsiosis, por ser las etiologías más frecuentes o por su interés epidemiológico, en comparación con el resto de grupo mediante análisis univariante.

Grupo CMV: Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las variables que se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Análisis univariante de pacientes con CMV vs resto

CMV	Si vs No	p	RR	IC 95%
Sexo femenino	44,1% vs 31%	0,054	0,63	0,40-1.006
Población urbana	74,6% vs 55,8%	0,012	2,03	1,18 – 3,49
Contacto con medio rural	7% vs 20%	0,032	0,35	0,13-0,93
Neutrófilos < 2500	42,4% vs 17,9%	< 0.001	2,37	1.60 -3.50
Linfocitos > 4000	47,5% vs 12%	< 0.001	3,94	2,59 -5,98
VSG < 30 mm	72,9% vs 40,5%	< 0.001	1,80	1,46 -2,20
LDH > 500 UI/L	64,4% vs 39,1%	< 0.001	1,65	1,30 -2,10
GPT > 150 UI/L	35,6% vs 21,2%	0.028	1,68	1,11 -2,54

Grupo VEB: Se realizó el mismo análisis. Los resultados se muestran en la tabla 15

Tabla 15. Análisis univariante de las variables asociadas a la infección por VEB

VEB	Si vs No	P	RR	IC 95%
Edad	28,1 ±14.7 vs 39,1 ± 13,7	< 0.001	-	-
Contacto con medio rural	34,8% vs 15,9%	0,041	2,19	1,18–4,06
Ictericia	8,7% vs 0,6%	0,015	13,48	1,99-91,36
Faringoamigdalitis	13% vs 1,6%	0,006	8,06	2,05-31,64
Hepatomegalia	26,1% vs 8,1%	0,012	3,22	1,47-7,06
Neutrófilos < 2500/uL	56,5% vs 19,7%	< 0,001	2,87	1,88-4,39
Linfocitos > 4000 /uL	52,2% vs 15,8%	< 0,001	3,30	2,07-5,27
LDH > 500 UI/L	87% vs 40,3%	< 0,001	2,16	1.75-2.66
GOT > 150 UI/L	39,1% vs 10,6%	< 0,001	3,68	2,01-6,72
GPT > 150 UI/L	52,2% vs 21,6%	0,002	2,41	1,55-3,77
GGT > 150 UI/L	47,8% vs 28,1%	0,045	1,70	1,07-2,71

Grupo Fiebre Q: Las variables asociadas significativamente a la infección por *Coxiella burnetii* se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Análisis univariante de variables asociadas al diagnóstico de Fiebre Q.

FIEBRE Q	Si vs No	P	RR	IC 95%
Inyección conjuntival	8,3% vs 1%	0,18	8,22	1,72 – 39,23
Linfocitos > 4000/uL	2,8% vs 20,2%	0,048	0,17	0,02-1,16
PCR <20 mg/L	22,2% vs 48,8%	0,004	0,46	0,24-0,85
GGT > 150 UI/L	47,2% vs 27,3%	0,022	1,73	1,17-2,56

Grupo Rickettsias (*R. typhi*, *R. conorii*, *R. felis* y SFGR): Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de grupos en el análisis univariante entre las variables que se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Análisis univariante de las variables asociadas al diagnóstico de Rickettsiosis.

RICKETTSIAS	Si vs No	P	RR	IC 95%
Sexo masculino	88,9% vs 65,4%	0,040	1,36	1,13-1,63
Contacto con animales	77,8% vs 46,8%	0,020	1,66	1,26-2,18
Contacto con el medio rural	38,9% vs 15,9%	0,028	2,44	1,30-4,60
Artromialgias	83,3% vs 53%	0,023	1,57	1,25-1,98
Exantema	27,8% vs 8,9%	0,023	3,13	1,37-7,13
Naúseas / vómitos	39,8% vs 14,3%	0,012	2,72	1,44-5,16
LDH > 500 UI/L	83,3% vs 41,3%	0,0011	2,02	1,58-2,58

16. Análisis multivariante de las variables asociadas a etiologías más frecuentes

Grupo CMV: En los pacientes diagnosticados de CMV, las variables que se asociaron con más frecuencia a esta etiología respecto al resto en el análisis multivariante fueron: Procedencia de un área urbana, no haber tenido contacto con medio rural, VSG < 30 mm/h, Neutropenia < 2500/ul y Linfocitosis > 4000/ ul. (tabla 18)

No demostraron asociación independiente: LDH > 500 UI/l, GPT > 150 UI/l, el sexo femenino y la edad.

Tabla 18. Variables asociadas a diagnóstico de CMV en análisis multivariante

CMV			
	p	Exp(B)	IC 95% ExpB
Población urbana	0,049	2,04	1,004-4,16
Contacto medio rural	0,017	0,23	0,06-0,77
VSG < 30 mm	0,001	3,21	1,59 -6,49
Neutopenia < 2500/uL	0,006	2,74	1,33–5,64
Linfocitosis > 4000/uL	<0,0001	7,46	3,53 – 15,87

Grupo VEB: Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis multivariante entre las siguientes variables analizadas: Edad (población más joven que en el resto de los grupos), artromialgias como síntoma clínico en el momento de la primera evaluación, hepatomegalia a la exploración, LDH > 500 UI/l y neutropenia < 2500/ul.(tabla 19)

No mostraron una asociación independiente: Sexo masculino/femenino, ictericia, faringoamigdalitis, GOT > 150 UI/l, GPT > 150 UI/l, contacto con medio rural, linfocitos > 4000/ul, GGT > 1050 UI/l.

Tabla 19. Variables asociadas a diagnóstico de VEB en análisis multivariante

VEB			
	p	Exp(B)	IC 95% ExpB
Edad	0,007	1,07	1,02-1,13
Artromialgias	0,013	0,23	0,072-0,73
Hepatomegalia	0,044	4	1,03-15,38
LDH > 500 UI/L	0,008	6,6	1,65-27,02
Neutropenia < 2500/uL	0,016	4	1,29-12,34

Grupo Fiebre Q: Se asociaron de forma significativa a esta etiología en el análisis multivariante las siguientes variables: La existencia de inyección conjuntival a la exploración, linfocitosis > 4000/uL y una PCR > 20 mg/dl. (tabla 20)

No se asociaron de manera independiente las siguientes variables: Sexo, edad y GGT > 150 UI/L.

Tabla 20. Variables asociadas a diagnóstico de Fiebre Q en análisis multivariante

FIEBRE Q			
	p	Exp(B)	IC 95% ExpB
Inyección conjuntival	0,015	22,22	1,83-250
Linfocitosis > 4000	0,021	0,06	0,006-0,65
PCR < 20 mg/L	0,32	0,39	0,16-0,92

Grupo Rickettsias (*R. typhi*, *R. conorii*, *R. felis* y SFGR): Las variables que se asociaron a esta etiología en el análisis multivariante fueron: El contacto con animales previo al episodio, artromialgias en la exploración inicial, náuseas ó vómitos y una LDH > 500 UI/l entre los parámetros analíticos (tabla 21).

No hubo asociación independiente con las variables: Edad, contacto con medio rural, exantema y sexo femenino.

Tabla 21. Variables asociadas a diagnóstico de Rickettsias en análisis multivariante

RICKETTSIAS			
	p	Exp(B)	IC 95% ExpB
Contacto con animales	0,016	4,42	1,31-14,92
Artomias	0,026	4,52	1,20-1,69
Náuseas / vómitos	0,007	4,85	0,001-15,15
LDH > 500 UI/L	0,006	6,21	1,68-22,72

17. Análisis univariante de variables asociadas a grupos etiológicos

Grupo VEB/CMV: Se agruparon los pacientes con diagnóstico de CMV y/o VEB. Se analizaron todas las variables demográficas, epidemiológicas, clínicas y analíticas recogidas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los grupos en las que se muestran en la tabla 22.

**Tabla 22. Análisis univariante de las variables asociadas al grupo etiológico
VEB/CMV**

CMV + VEB		P	RR	IC 95%
Edad	35,2 ±12,9 vs 39,5 ± 14,2	0,013	-	-
Población urbana	71,6% vs 54,7%	0,008	1,31	1,10-1,56
Tiritonas	42% vs 53,4%	0,049	0,77	0,59-1,02
Naúseas / vómitos	9,1% vs 18%	0,049	0,51	0,25-1,03
Diarreas	0% vs 10,6%	0,003	0	0,0-0,39
Hepatomegalia	14,9% vs 7,3%	0,036	2,03	1,04-3,98
Neutrófilos < 2500/uL	44,3% vs 14,3%	<0,001	3,10	2,11-4,56
Linfocitos > 4000 /uL	48,9% vs 7,3%	<0,001	6,65	4,06-10,89
VSG < 30 mm	64,8% vs 39,6%	<0,001	1,64	1,32-2,04
LDH > 500 UI/L	70,5% vs 33,9%	<0,001	2,08	1,67-2,59
GOT > 150 UI/L	22,7% vs 9%	0,016	2,53	1,45-4,41
GPT > 150 UI/L	39,8% vs 18%	<0,001	2,21	1,53-3,21

Grupo de patologías tratables con Doxiciclina: Se incluyeron dentro de este grupo los pacientes con diagnóstico de: *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp. y *Anaplasma* spp. Se analizaron todas las variables demográficas, epidemiológicas, clínicas y analíticas. Los resultados del análisis univariante se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Análisis univariante de las variables asociadas a las patologías tratables con doxiciclina.

TRATABLES CON DOXICICLINA		P	RR	IC 95%
Sexo masculino	81,3% vs 62,4%	0,003	1,30	1,13-1,51
Contacto con el medio rural	29,3% vs 13,6%	0,0026	2,15	1,35 – 3,44
Contacto con animales	58,7% vs 45,5%	0,045	1,29	1,02 – 1,63
Tiritonas	61,3% vs 48,1%	0,043	1,28	1,02-1,59
Naúseas / vómitos	24% vs 13,2%	0,036	1,82	1,09-3,03
Síntomas urinarios	9,3% vs 3,5%	0,044	2,68	1,03-6,94
Linfocitos < 1500/uL	88% vs 76%	0,037	1,16	1,04-1,29
PCR < 20 mg/L	34,7% vs 49,2%	0,036	0,70	0,50-0,98
GGT > 150 UI/L	44% vs 25,2%	0,002	1,75	1,25-2,43

18. Análisis multivariante de las variables asociadas a grupos etiológicos

Grupo CMV/VEB: Se asociaron de forma independiente en el análisis estadístico con este grupo las siguientes variables: Sexo femenino, procedencia de población urbana, fiebre acompañada de tiritonas, náuseas ó vómitos en el momento de la primera consulta, neutrófilos < 1500/ul entre los parámetros analíticos, linfocitos > 4000/ul, VSG < 30 mm/h y LDH > 500 UI/l. (tabla 24)

No hubo asociación independiente entre la edad, la existencia de hepatomegalia en el momento de la exploración inicial y las transaminasas > 150 UI/l.

Tabla 24. Análisis multivariante de las variables asociadas al grupo CMV/VEB

CMV/VEB			
	p	Exp(B)	IC 95% ExpB
Sexo femenino	0,009	2,46	1,24 – 4,85
Población urbana	0,004	2,72	1,37 - 5,40
Tirtonas	0,044	0,51	0,26 - 0,98
Naúseas / vómitos	0,031	0,33	0,12 - 0,90
Neutrófilos < 1500/uL	0,001	3,36	1,69 - 6,65
Linfocitos > 4000/uL	< 0,0001	9,1	4,21 – 19,66
VSG < 30 mm	0,012	2,24	1,19 - 4,23
LDH > 500 UI/L	0,001	3,36	1,69-6,65

Grupo de patologías tratables con doxiciclina: En el examen multivariante demostraron asociación independiente con este grupo etiológico las siguientes variables: Sexo masculino, haber tenido contacto con medio rural, presentar náuseas ó vómitos en el momento de la primera consulta, los síntomas urinarios, y entre los parámetros analíticos la linfopenia < 1500/ul y una PCR < 20 mg/l. (tabla 25).

No demostraron asociación independiente las variables: Edad, tirtonas, contacto con animales y una GGT > 150 UI/l.

Tabla 25. Análisis multivariante de las variables asociadas al grupo de patologías tratables con doxiciclina.

TRATABLES CON DOXICICLINA			
	p	Exp(B)	IC 95% ExpB
Sexo masculino	0,007	2,63	1,30 - 5,31
Contacto medio rural	0,001	3,12	1,65 - 6,62
Naúseas / vómitos	0,042	2,15	1,59 - 4,50
Síntomas miccionales	0,006	4,90	1,59 -15,15
Linfocitos < 1500/uL	0,008	2,97	1,32 - 6,71
PCR < 20 mg/L	0,046	0,53	0,29 - 0,98

VI.DISCUSIÓN

Cambios en el espectro etiológico de la FDI

La fiebre sin focalidad sigue siendo un motivo de consulta frecuente en la práctica clínica actual, pues en nuestro entorno socio-cultural se interpreta como uno de los principales signos de alarma de cualquier patología. La fiebre de corta duración suele ser atendida en la mayoría de los casos por los médicos de atención primaria, sin embargo, cuando afecta al estado general y se prolonga a pesar de tratamiento sintomático o en ocasiones, de antibioterapia de amplio espectro, se suele acudir a la asistencia hospitalaria.

Sin embargo en 1984, cuando surgió la necesidad en nuestra comunidad de crear un nuevo protocolo diagnóstico para definir una nueva entidad como la fiebre de duración intermedia, por presentar unas características clínicas, etiológicas y epidemiológicas diferenciadas de la fiebre de corta duración y de la FOD¹¹⁹ el escenario era distinto al que nos encontramos hoy en día. La atención primaria en Andalucía, tras la transferencia de competencias sanitarias de la Seguridad Social, estaba mucho de la actual, sobretodo en organización. Se trataba de una asistencia muy básica que se prestaba en ambulatorios y consultorios de la Seguridad Social que estaban centralizados en grandes núcleos de población y sólo pasaban consultas médicas dos horas y media al día. Las prestaciones de enfermería también eran muy limitadas, así como el acceso a los medios diagnósticos. En el área rural existían médicos y ATS que trabajaban de forma aislada. Tras la reforma sanitaria, que se prolongó hasta los 90, la plantilla de los centros de salud empieza a crecer y a diversificarse. Así, de 2,7 médicos por 10.000 habitantes (dato de 1984) se pasa a 8 médicos por 10.000 habitantes, con un incremento de cerca de 200%. Igualmente, de 4 enfermeros por 10.000 habitantes se pasa a 7 por 10.000 habitantes, con un incremento del 75%. El desarrollo inicial de la red de Centros de Salud permitió que de una cobertura de un 50% de la población en 1990 pasáramos al 100% en la actualidad. La atención

especializada también ha cambiado notablemente, de los 45 hospitales públicos andaluces de hoy en día, 18 se han construido e inaugurado desde los años 90 y existen 9 Centros de Alta resolución en Andalucía donde se derivan gran número de pacientes de áreas rurales¹²⁰.

Esto, junto a las campañas de erradicación de brucelosis de las cabañas ganaderas en Andalucía⁷², justifica el cambio en el perfil del paciente que acude a las consultas de los principales hospitales de nuestra comunidad, como comentaremos más adelante, así como el espectro etiológico de la Fiebre de Duración Intermedia (FDI) que ya se puso de manifiesto en nuestro artículo publicado en 2010, donde comparábamos los casos de FDI atendidos entre 1983-1989 y 2004-2005³¹.

Por lo tanto, no creemos que haya disminuido el número de casos de FDI en nuestra comunidad, probablemente la disminución de la incidencia observada con respecto a otros periodos, se puede explicar por la mejora de la asistencia sanitaria de áreas rurales, donde probablemente se siguen manejando un considerable número de casos.

Distribución geográfica de los casos incluidos

Como se observa en la tabla 1, la provincia más representada en nuestro estudio, por ser la que más número de casos ha incluido es Sevilla (264 pacientes vs 129 procedentes del resto de provincias andaluzas), por lo tanto resulta complicado hablar de la prevalencia de las distintas etiologías según el área geográfica.

El análisis es mucho más limitado cuando comparamos los casos que se han incluido en Andalucía oriental (86) con los de Andalucía occidental (307). Por lo tanto no hablaremos de prevalencia de la FDI en las distintas provincias, si no de la distribución de las diferentes etiologías según el número de casos aportados.

Características demográficas

Entre las características demográficas analizadas, cabe destacar que el paciente que acude por fiebre sin focalidad a la consulta de atención especializada suele ser relativamente joven, con una edad media de 35 años, esto coincide casi en todas las series de FDI recogidas¹²¹.

Existe un bajo porcentaje de pacientes procedentes de áreas rurales (6%), lo cual se explicaría, como comentábamos previamente, por la mejora de la atención primaria y especializada en áreas rurales, donde la exposición profesional es uno de los principales factores de riesgo de la mayoría de las zoonosis. Las profesiones relacionadas con la agricultura y/o ganadería están escasamente representadas en nuestra muestra (7,8%). La mayoría de los pacientes proceden de áreas urbanas y se dedican profesionalmente a tareas relacionadas con el trabajo en oficina.

Características epidemiológicas

Entre las variables epidemiológicas analizadas, la más frecuente fue el contacto con animales, referido por casi la mitad de los pacientes (48,8%), principalmente con perros (35,4%). Sólo un 3% de los pacientes refería contacto con gatos, pese a que en el estudio final hubo 18 serologías positivas a *Bartonella henselae*, que utiliza habitualmente a este animal como reservorio. Tan sólo 56 pacientes habían tenido contacto con el medio rural en los meses previos al episodio. Estos datos no son de extrañar, ya en el estudio previo elaborado por Viciano *et al* un 37,7% de los pacientes no presentaban ningún antecedente epidemiológico de interés para el episodio, a pesar de la alta incidencia de zoonosis registrada por entonces¹¹⁹.

Características clínicas y asistenciales

La mayoría de los pacientes fueron derivados desde el servicio de urgencias (91,9%), lo cual se explica una vez más por el cambio en la organización de la atención primaria, desde donde se derivaron menos del 3% de los casos, así como el mayor grado de formación para el manejo de la fiebre sin focalidad en los centros de salud y los hospitales regionales²⁹.

Casi la mitad de los pacientes (45%) había recibido tratamiento antibiótico empírico antes de la primera visita en nuestras consultas, la mayoría había recibido antibioterapia de amplio espectro, como es amoxiciclina-clavulánico, sola o asociada a otros antibióticos, principalmente quinolonas. Un 9% recibió tratamiento antimicrobiano empírico con doxiciclina. El uso de antimicrobianos con actividad frente a las zoonosis más frecuentes en nuestro medio, puede haber sido uno de los factores que haya influido en la disminución de la incidencia en los últimos años. En concreto, el uso de doxiciclina está recomendado por el Proceso Asistencial Integrado de FDI²⁹

En cuanto al resto de características clínicas de los pacientes, la fiebre siguió un patrón diario en la mayoría de los casos, con una temperatura media elevada ($39,1 \pm 0,64$ °C). Los síntomas más frecuentes fueron las artromialgias (57,4%), la cefalea (54,1%) y los escalofríos-tirtonas (51,1%), en series anteriores, los síntomas más frecuentes fueron similares, aunque cerca del 63,2% de los pacientes presentó sudoración, síntoma que no fue recogido en nuestro estudio. Entre los hallazgos más frecuentes en la exploración se encontraron la hepatoesplenomegalia, las adenopatías y el exantema, que se dio en el 9,9% de los pacientes. Es preciso comentar, que las adenopatías a la exploración fueron menores a 2 cm e inespecíficas, puesto que los cuadros poliadenopáticos sugestivos de mononucleosis se excluyeron desde el inicio.

Alteraciones analíticas más frecuentes

Coincidiendo nuevamente con otras series publicadas, las alteraciones analíticas más frecuentes fueron la alteración de la bioquímica hepática, sin elevación de la bilirrubina. La elevación de la LDH por encima de 500 UI/l (58,7%), tan frecuente como inespecífica, la neutropenia por debajo de 2500/ul (24%) y la linfopenia < 1500/ul (27%). Sólo un 17% de los pacientes presentó anemia y un 2,4% plaquetopenia. En la serie de 233 pacientes publicada por Parra *et al* las alteraciones analíticas fueron muy similares, siendo las más frecuentes las alteraciones de las transaminasas, sobretodo la GGT¹²¹. Sin embargo series más antiguas, como la publicada por Viciano *et al*, a pesar de coincidir con el resto en la elevación de transaminasas de cerca del 60% de la muestra, presentaron un 54% de pacientes con anemia¹¹⁹.

Rentabilidad de hemocultivos y urocultivos

A pesar de que la extracción de hemocultivos estaba en el protocolo de manejo inicial de la FDI, tan sólo se realizaron en el 62,8% de los pacientes. La rentabilidad en general fue baja, pues tan sólo se aislaron microorganismos en 9 pacientes (4,43% de los realizados) pero podemos considerarlos rentables en el caso de *Brucella*, puesto que los hemocultivos fueron positivos en 5 de los 8 casos (62,5%) registrados en el estudio inicial, porcentaje que coincide con la sensibilidad estimada del hemocultivo que oscila según las series entre el 15-85%^{75, 122}.

Respecto a los urocultivos se realizaron en el 92,2% de los pacientes, resultando positivos sólo en el 5% de los casos. Probablemente, se solicitaron como screening inicial, puesto que sólo presentaban leucocituria 46 pacientes (16%) siendo su rentabilidad en general baja. En 6 pacientes se consideró bacteriuria asintomática.

En ausencia de síntomas miccionales o leucocituria, el urocultivo parece entorpecer el diagnóstico más que aclararlo.

Otras pruebas complementarias

Se solicitó ecografía abdominal en 92 pacientes (27,6%), sin embargo su resultado fue orientador solamente en el 25% de los casos. Principalmente en los casos de pielonefritis aguda, abscesos intrabdominales y neoplasias.

Se solicitó TAC abdominal en 32 pacientes (9,6%) siendo el resultado orientador en la mitad de los casos.

No hemos detectado un abuso en la solicitud de pruebas de imagen para el diagnóstico inicial de la FDI, no obstante, éstas deberían limitarse a los casos de alta sospecha clínica de infecciones localizadas o neoplasias tras un estudio inicial negativo.

Tratamiento y evolución

Recibieron tratamiento empírico con doxiciclina en consulta especializada el 57% de los pacientes, tal y como indica el protocolo de fiebre de duración intermedia²⁹.

Un total de 141 pacientes recibieron tratamiento sintomático (42,34%) a pesar de las recomendaciones. La fiebre sin embargo, tardó una mediana de 3 días en desaparecer desde el inicio del tratamiento empírico en el total de los casos.

Uno de los datos que pone de manifiesto el cambio en el manejo de la FDI en nuestro medio, es el bajo porcentaje de pacientes que requirieron ingreso hospitalario (15,5%) si comparamos esta cifra con la del estudio anterior realizado de 1983-1989, en este

periodo ingresaban el 59,6% de los casos de FDI, principalmente en áreas rurales y en personas de mayor edad. La tasa de ingresos era mayor en verano y otoño, estaciones de mayor incidencia estacional de zoonosis y proporcionalmente los casos de Fiebre Q ingresaban con mayor frecuencia debido a la afectación general que ésta produce^{31, 119}. Sin embargo en la actualidad, la mayoría de los pacientes se manejan de forma ambulatoria, probablemente porque ha mejorado el acceso de los pacientes a la atención especializada de consultas, porque sabemos por estudios anteriores que el comportamiento del cuadro es generalmente benigno, y la mayor formación de los especialistas lleva a la sospecha precoz del cuadro y al uso inicial de doxiciclina incluso desde el servicio de urgencias hospitalarias.

La mayoría de los pacientes curaron sin secuelas, evolucionaron a FOD pocos pacientes (7,1%), en la mayoría de los casos, pacientes que permanecieron sin diagnóstico incluso tras los estudios centralizados, el resto de etiologías son muy diversas y la baja prevalencia nos ha impedido poder analizar los factores que influyen en la evolución a FOD más en profundidad.

Tan sólo tres pacientes fallecieron, por lo que es imposible estudiar de manera fiable los factores asociados con mortalidad, aunque teniendo en cuenta que 2/3 (66%) eran casos diagnosticados de neoplasia (linfoma y neoplasia vesical) quizás éste hecho es el principal factor relacionado con la mortalidad de la serie.

En la serie de Viciano *et al* no murió ningún paciente¹¹⁹, tampoco en el estudio de Parra *et al* en Granada¹²¹. En series no europeas la mortalidad también es baja a pesar de la mayor incidencia de zoonosis, como en la serie tailandesa de Leerasamee *et al*¹⁷.

Etiología inicial tras estudio convencional

Muchos de los pacientes excluidos fueron errores en los criterios de inclusión iniciales en el estudio y otros muchos por falta de la segunda muestra serológica a los 21 días de la primera. Como ya comentamos previamente, la fiebre tuvo una duración de unos 3 días de media tras la primera consulta, por lo que menos pacientes acudieron para una nueva extracción, una vez que el cuadro había remitido.

No obstante, de los 333 pacientes que fueron analizados, las pruebas serológicas arrojaron luz en la mayoría de los casos, pero muchas dudas también en otros.

Fue posible establecer un diagnóstico tras los estudios iniciales en 214 pacientes (64,2%) mientras que en un porcentaje elevado de casos (35,7%) fue imposible, tras analizar las pruebas complementarias, llegar a un diagnóstico final.

El porcentaje de pacientes sin diagnóstico en otras series varía desde el 18,8% de la serie de Viciano *et al*¹¹⁹ al 65% de la serie de Parra *et al*¹²¹ en esta misma área.

Las viriasis fueron la causa más importante de FDI en este estudio, por delante de la Fiebre Q y las Rickettsias en conjunto. Este estudio es el primero en el que las causas víricas superan en número y por amplia diferencia a las zoonosis. La Fiebre Q ha sido clásicamente la principal causa de FDI en nuestra región^{28, 119, 121}.

Entre las causas víricas, la más frecuente ha sido la infección por CMV detectada en el 18% de los pacientes, pero la serología se consideró dudosa en un 68% de los casos, en muchos de ellos por reactividad a títulos bajos de IgG para *Coxiella burnetii* o para otras Rickettsias o bien por positividad para CMV y VEB. Las dificultades para el diagnóstico de infección por CMV en pacientes inmunocompetentes son bien conocidas, la prevalencia en la población española se estima entre el 70-80% y la persistencia de anticuerpos IgM de hasta 2-3 meses tras la infección no facilita la interpretación de los resultados serológicos al clínico⁹³. Consideramos infección por

CMV en aquellos pacientes con IgM positiva en primera o segunda determinación y sin diagnóstico alternativo. En nueve casos la serología fue positiva para CMV y VEB, estos casos, junto a otros casos dudosos se enviaron al laboratorio experimental para confirmación mediante técnicas de RT-PCR.

El número de pacientes diagnosticados de Fiebre Q fue más bajo que en series previas: 14,4% frente al 21,4% de los pacientes en la serie de Viciano *et al*¹⁹, con un resultado parecido, el 13,7% al de la serie de Parra *et al*²¹. Esta disminución del número de casos, podría deberse una vez más a las mejoras del acceso sanitario en áreas rurales, donde es posible que se estén atendiendo muchos de los casos que hemos dejado de ver en hospitales de referencia. Sin embargo, aunque el reservorio primario de *Coxiella burnetii* se encuentra en cabras, ovejas, gatos y vacas y que el mecanismo de transmisión es fundamentalmente por vía aérea²³, estos factores epidemiológicos no se daban con mayor frecuencia en los pacientes diagnosticados de Fiebre Q en series previas en nuestra área geográfica, por lo que es posible que la prevalencia de Fiebre Q simplemente haya disminuido respecto a años previos.

Hubo al menos seis casos de reacciones cruzadas entre *Coxiella burnetii* y otras Rickettsias, pero con títulos más altos para *C.burnetii*, por lo que se dio como diagnóstico cierto, no obstante, estos casos se seleccionaron para estudio centralizado.

También observamos un notable descenso de Rickettsiosis en nuestra serie, con un descenso de Fiebre botonosa del 11,2% registrado en los años 1983-1989 al 1,5% actual y un descenso menos marcado del Tifus murino del 7,3% al 2,4%¹⁹

Otro dato relevante es el escaso número de brucelosis (2,4%) frente al porcentaje observado en series previas (19,2%) algo que confirma la tendencia que

observábamos en años previos en consulta y que ya se comentaba previamente en la introducción⁷².

Entre el resto de causas, al margen de las infecciones sistémicas, se diagnosticaron 6 casos de pielonefritis, todas con urocultivo positivo, por lo que el diagnóstico no supuso más dificultad, a pesar de manifestarse clínicamente sin un claro síndrome miccional. En el caso de los abscesos intrabdominales, como es de suponer, hubo que recurrir a pruebas de imagen para la confirmación diagnóstica (3 abscesos hepáticos y 1 endometrioma sobreinfectado).

Del resto de etiologías no infecciosas, destacan las colagenosis, que sin embargo no presentaron una mayor duración de la fiebre respecto a otras etiologías ni características propias, siendo la colagenosis más frecuente la arteritis de la temporal y las vasculitis. No ha sido posible estudiar los factores relacionados con los casos de colagenosis, por el escaso número de casos.

Decidimos además no agrupar las etiologías no infecciosas para el análisis, por el escaso número de casos y las grandes diferencias entre ellas: poco tendrían en común las tiroiditis, con las neoplasias o con la enfermedad de Still.

Realización de estudios centralizados

Se realizaron estudios centralizados en el 62,4% del total de los pacientes. En los pacientes en los que no fue posible trabajar con las muestras enviadas, un total de 72, en la mayoría hubo problemas con la congelación de la muestra, muchos tubos venían rotos tras la congelación por haberse excedido en la cantidad de sangre enviada en cada uno de ellos, en otros casos, faltaban las muestras de la segunda visita, o no se había guardado la cadena de frío necesaria para la conservación de la muestra.

El 88% de las muestras de pacientes sin diagnóstico fueron enviadas para estudios centralizados. Quizás el grupo etiológico más importante para los objetivos de nuestro estudio.

No obstante, se obtuvo un diagnóstico final tras estudio centralizado mediante serología en 25 casos (23,58%) del total de 106 muestras enviadas.

B. henselae como causa de FDI en pacientes sin diagnóstico previo

Entre los pacientes sin diagnóstico inicial hubo 13 pacientes con títulos diagnósticos ($>1/128$) para *B.henselae*. Con excepción de tres casos, en el resto se obtuvieron títulos positivos también para otras Rickettsias o para *Anaplasma* spp., todos ellos inferiores a 1/64, por lo que se consideraron reacciones cruzadas. En ninguno de los casos diagnosticados de *Bartonella* se obtuvieron títulos superiores a 1/256. El punto de corte fue el establecido por el Parc Taulí, confirmándose en la mayoría de las revisiones sobre el diagnóstico microbiológico de *Bartonella* spp.^{39, 81, 124}

Las principales dificultades diagnósticas de la serología derivan de la forma de obtención del antígeno de *Bartonella* spp. para ELISA ó IFI (agar o cultivo celular) según el seleccionado, la respuesta serológica puede variar. En nuestro caso se obtuvo por cultivo celular según indicaciones del fabricante del kit comercial.

En nuestro estudio, a pesar de realizarse cultivo en placas de agar de todas las muestras de serologías positivas durante al menos dos meses, no obtuvimos ningún aislamiento de *Bartonella* spp., lo que nos obliga a ser cautos a la hora de valorar estos resultados.

Revisando la literatura, encontramos series de casos de enfermedad por arañazo de gato, con títulos diagnósticos no especialmente elevados e incluso en ocasiones, en

descenso en la segunda determinación, como en la serie estadounidense de Dalton *et al*¹²⁴.

Sin embargo hay pocos estudios sobre la presentación clínica de *Bartonella* spp. como fiebre sin focalidad en adultos, la única serie publicada que incluía adultos es la recogida por Masato Tsukahara *et al.* en Japón, en la que se recogen 14 pacientes con fiebre prolongada (>de 7 días), 6 de ellos con linfadenopatías aunque sin clínica de enfermedad por arañazo de gato, entre los que sólo se incluyó un adulto de 25 años, el resto eran menores de 14 años. Los títulos de *Bartonella* spp. fueron positivos con títulos superiores a 1/128 en la primera determinación y todos aumentaron al menos 4 campos en la segunda determinación. En todos los casos había antecedentes de contacto con gatos y/o perros. El autor sugiere, que en los niños y adultos jóvenes con fiebre de más de 7 días sin foco, con o sin adenopatías, que tengan contacto con mascotas (gatos y/o perros), debe considerarse el diagnóstico de *Bartonella* spp.

Existen en la literatura presentación de casos aislados o series cortas (4-5 pacientes) con infección por *Bartonella* spp. confirmada por serología que se presentaban como fiebre sin focalidad.

Donde la fiebre sin focalidad parece una forma de presentación más frecuente es en los niños, entre los que suele ser habitual el antecedente de contacto con gatos y/o perros^{47, 84}.

Hubo cinco casos más de serología positiva de Bartonella: 2 pacientes diagnosticados inicialmente de infección por CMV que presentaron PCR negativa para virus, 2 pacientes diagnosticados de Fiebre Q con títulos bajos (<1/512) y 1 paciente con titulaciones para *R. conorii* de 1/128 en ambas determinaciones y que se había clasificado como Fiebre botonosa.

Entre el total de 18 casos de *B.henselae* de nuestro estudio, tan solo 7 pacientes referían contacto habitual con perros, ninguno presentaba adenopatías ni hepatoesplenomegalia y la edad media fue de 35 años. La mayoría de los casos pertenecían a Andalucía occidental (83,3%). El 60% de los pacientes había recibido tratamiento antibiótico previo, principalmente con doxiciclina (7 pacientes), por lo que es posible que este hecho pudiera influir en el resultado negativo de todos los cultivos realizados.

En un estudio de seroprevalencia realizado en la provincia de Sevilla en 146 individuos sanos se detectó positividad para anticuerpos IgG de *Bartonella* spp. (IgG>128) en el 24,7%¹²⁵.

Por este y por otros motivos, seremos cautos con estos resultados, puesto que al no tener confirmación mediante técnicas moleculares no podemos afirmar que los 18 casos se traten realmente de infecciones por *B. henselae*, aunque en ninguno de estos pacientes hubo un diagnóstico alternativo del origen de su fiebre tras los estudios centralizados.

Sí podemos sugerir que en el diagnóstico inicial del paciente con FDI debería contemplarse esta etiología, sobretodo en pacientes con antecedentes epidemiológicos compatibles, como podría ser el contacto con perros y/o gatos.

***Anaplasma phagocytophilum* como causa de FDI**

En tres muestras se detectaron serologías positivas para *Anaplasma* spp.

La Anaplasmosis se transmite habitualmente a través de la picadura de garrapatas.

El cuadro clínico habitual provocado por este patógeno es la Anaplasmosis Humana Granulocítica (AHG) un cuadro caracterizado por fiebre y artromialgias.

Los tres pacientes diagnosticados en nuestro trabajo, no tenían diagnóstico concluyente previo, aunque en uno de ellos se observaron titulaciones no diagnósticas previas para *Coxiella burnetii* (1/256 y 1/128 en muestras separadas por 21 días) y tras estudios centralizados para *Bartonella* spp. (1/256 y 1/256) que se consideraron reacciones cruzadas, los títulos para *Anaplasma* fueron 1/20156 en primera muestra y 1/1024 en la segunda.

Los otros dos pacientes diagnosticados no presentaron títulos tan altos pero el resto de serologías fueron positivas.

Ningún paciente recordaba una picadura de garrapata, pero 2 de ellos trabajaban en medio rural. Todos los pacientes presentaron leucopenia, dato que apoyó el diagnóstico¹²⁶.

Aunque no es una causa de fiebre sin focalidad frecuente, la anaplasmosis es un patógeno emergente que se ha identificado en artrópodos en el norte de España^{89, 127} y que quizás deba ser tenido en cuenta como causa de fiebre sin focalidad en nuestra región, aunque tan solo hay casos aislados en España que cumplan todos los criterios diagnósticos¹²⁸

***Rickettsia felis* como causa de FDI**

Tan sólo hemos encontrado 3 casos que podemos clasificar como probable infección por *R. felis*, pues aunque ha habido más serologías positivas para *R. felis*, se han considerado reacciones cruzadas, en pacientes con tifus murino o una fiebre botonosa confirmada donde los títulos serológicos para estas dos entidades era muy superiores.

En dos de los tres casos diagnosticados no había un diagnóstico previo, en estos pacientes se obtuvieron títulos de 1/256 y 1/512 en primera y segunda visita y 1/64 y 1/128 respectivamente. En el último caso no hubo reacciones cruzadas, mientras que en el primero se detectaron anticuerpos con títulos menores a 1/256 para *R. typhi*, *R. conorii* y *R. bar29*.

En un paciente previamente diagnosticado de fiebre botonosa, se obtuvieron títulos para *R. felis* negativos en primera muestra y de 1/512 en la segunda, mientras que los títulos para *R. conorii* se mantuvieron estables en 1/128.

Dos de estos pacientes habían tenido contacto con gatos, sin embargo no hubo otros antecedentes epidemiológicos, como contacto con medio rural o picaduras de insectos que pudieran apoyar el diagnóstico clínico. Dos de los tres casos pertenecían a Andalucía oriental

Son sólo tres casos de los que probablemente se pueden sacar pocas conclusiones, sí puede tener interés desde el punto de vista epidemiológico, como ya señalaban estudios previos en el Sur de España⁴³.

Infección por VHH6 como causa de FDI

En cuatro pacientes la única serología positiva fue una IgM para VHH6 en la segunda muestra o en las dos, en tres de estos pacientes se habían obtenido serologías dudosas para CMV y VEB por lo que se enviaron también muestras para el laboratorio experimental sin que pudiera confirmarse el diagnóstico ni de CMV ni de VEB mediante RT-PCR. Por este motivo se asumió el diagnóstico de VHH6, la infección por este virus es muy diversa, en individuos inmunocompetentes afecta principalmente a niños y en adultos parece jugar un papel más importante en inmunocomprometidos⁹³.

106

En adultos inmunocompetentes su papel es incierto, como en todos los herpesvirus pueden quedar en estado de latencia y reactivarse tras la infección de otros patógenos.

En un paciente con serología dudosa inicial para VEB (muestra procedente de otros laboratorios informada como “positivo débil”) positivizó IgM para VHH6 en segunda muestra optándose por esta último diagnóstico como causante del cuadro febril.

Otro paciente diagnosticado de Fiebre Q en base a dos muestras positivas a títulos 1/64 en su hospital de origen, presentó IgM positiva en las dos determinaciones, considerándose también en este último el diagnóstico de infección por VHH6.

No obstante, seguimos teniendo nuestras dudas sobre la utilidad de la serología por VHH6 en el abordaje diagnóstico inicial de la FDI en pacientes adultos inmunocompetentes, probablemente en aquellos pacientes en contacto con niños pequeños, si pueda tener alguna utilidad.

Confirmación de diagnósticos previos

Tifus murino

En total, diagnosticamos 10 casos de tifus murino, añadiéndose a los 8 casos diagnosticados inicialmente un paciente con serología positiva sin diagnóstico inicial y un paciente que presentaba títulos de 1/256 a *R. conorii* y que en estudios centralizados duplicó los títulos a *R. typhi* (1/1024) con cultivo positivo.

En principio sólo sería posible encontrar PCR positivas frente a elevados títulos serológicos que son indicativos de bacteriemia. Sin embargo, debido a que la bacteriemia comprende un breve espacio de tiempo, la técnica de PCR presenta dificultades en cuanto a sensibilidad. En nuestro caso, se realizó PCR a todos los resultados positivos por serología, independientemente de título, y sin que éste se conociera en el momento de realizar la PCR, con el fin de tener una interpretación objetiva de los resultados. Únicamente se obtuvo un pico susceptible de ser positivo en un paciente con títulos superiores a 1/1024 en el que no se obtuvo amplificación suficiente para obtener secuenciación⁵⁰.

Debido a que sólo los títulos elevados son indicadores de infección reciente y, por tanto, son los que sugieren la posibilidad de encontrar *Rickettsia* spp. en sangre, se escogieron para realizar el cultivo, aquellos pacientes con títulos elevados para una o más *Rickettsia* spp. (12 pacientes).

Como la eficiencia del cultivo no es elevada, el tiempo de bacteriemia corto y la concentración en sangre de *Rickettsia* no es muy alta, la probabilidad de conseguir cultivos positivos no es muy elevada. Por este motivo, se modificó el protocolo estándar de cultivo. Una vez finalizado el cultivo en *shell vial*, no se reveló con IFA, puesto que con ello se perdería parte de la posible *Rickettsia*, si no que se pasó

directamente a botella y se trató la muestra como si fuera positiva hasta el final, no descartándola en ningún momento.

Los tiempos de incubación fueron largos y con bastantes cambios de medio pues se partía inicialmente de 4 *shell vials* por paciente, tratados independientemente como si fueran muestras distintas. Todo este proceso llevó más tiempo y más número de *shell vials* y botellas, pero se consideró que era la manera de conseguir algún positivo. Finalmente se obtuvo un cultivo positivo que reaccionó para suero de *Typhus group*, este suero tiene antígenos tanto para *R. typhi* como *R. prowazekii*, por lo que se concluyó que tanto a nivel epidemiológico como clínico este cultivo fue positivo para *R. typhi*, hecho interesante por el aislamiento de *R. typhi* en una muestra humana fruto de la experiencia y el arduo trabajo de la doctora Nogueras^{49, 56, 58, 129}

Fiebre botonosa

Tras los estudios centralizados, diagnosticamos de fiebre botonosa a un paciente sin diagnóstico previo pero perdimos 4 casos previamente diagnosticados de fiebre botonosa pero que se reclasificaron tras obtenerse en las mismas muestras títulos diagnósticos más elevados para *R. typhi*, *R. felis*, *Bartonella* spp. y una SFGR, considerándose los títulos iniciales de *R. conorii* como una reacción cruzada.

Un caso de fiebre botonosa diagnosticada en base a dos títulos de 1/128 se reclasificó como VEB tras obtenerse IgM positiva en las serologías de los estudios centralizados con confirmación mediante RT-PCR.

Una vez más, las técnicas serológicas nos pusieron grandes dificultades para interpretar los resultados, lo que parece notable es la disminución del número de casos de fiebre botonosa en nuestra región. Desconocemos la prevalencia de infección por *R. conorii* en las garrapatas de perro en nuestra área, pero tal como se

advertía en otros estudios, la incidencia parece ir en descenso también en Andalucía⁵⁷,

130

Infección por CMV

La infección por CMV ha sido con diferencia el diagnóstico más frecuente en nuestra serie. El grupo de herpesvirus ha sido el que más problemas ha planteado a la hora de interpretar las pruebas serológicas y las obtenidas mediante estudios moleculares.

El número de diagnósticos finales es el resultado de 4 casos dudosos no confirmados mediante RT-PCR y descartados definitivamente por serología positiva de *Bartonella* spp. en 2 pacientes y a SFGR en otro, y a una IgM positiva en segunda muestra (seroconversión) a PVB19. A estos se sumaron 6 casos nuevos inicialmente diagnosticados de VEB con positividad para ambos virus y en los que se detectaron más de 200 cops/ml de ADN viral de CMV mediante RT-PCR con ADN viral de VEB negativo o inferior a 20 cops/ml.

Son bien conocidas las reacciones serológicas cruzadas entre CMV y VEB, con una alta tasa de falsos positivos de IgM para CMV¹³¹ difíciles de interpretar y también con otros virus, como los virus de la hepatitis E y A¹³².

Nos pareció que la técnica comercial de RT-PCR para virus herpes podía arrojar algo de luz para establecer el diagnóstico entre los pacientes con serologías positivas o dudosas a ambos virus (20 pacientes). Sin embargo, los resultados de las técnicas moleculares están bien estandarizados en pacientes trasplantados^{101, 133, 134} pero en pacientes inmunocompetentes se desconoce el punto de corte para considerar una infección reciente, puesto que su aplicación en la actualidad se restringe al seguimiento de pacientes trasplantados y otros inmunodeprimidos¹⁰⁰⁻¹⁰².

En nuestro estudio se consideró un punto de corte arbitrario en unas 400 cops/ml para considerar cierto el diagnóstico, en los casos en los que se detectaba carga viral

positiva para ambos virus se optaba por la más elevada para decidir el diagnóstico, cuando no había diferencias significativas se diagnosticaban de coinfección por CMV y VEB.

Independientemente de las dudas diagnósticas que pueda sugerirnos, el papel del CMV en la fiebre sin focalidad es bien conocido⁹⁸ y en caso de un cuadro febril con serología positiva y ADN viral circulante detectado mediante técnicas de RT-PCR, sin que exista un diagnóstico alternativo firme nos hace afirmar que CMV es la causa más frecuente de FDI en nuestro estudio, y que debe sospecharse siempre en pacientes con fiebre sin focalidad.

VEB y coinfección CMV-VEB

De los 24 pacientes inicialmente clasificados como VEB, 8 pacientes confirmaron un diagnóstico final diferente: 6 pacientes se diagnosticaron de CMV, como ya comentábamos previamente, otro paciente se diagnosticó de VHH6 (IgM positiva) con ADN viral de VEB negativo y otro se diagnosticó de coinfección por CMV y VEB.

Un caso de *R. conorii* con serología no confirmada mediante centralizados se diagnosticó de VEB tras RT-PCR positiva a títulos de 2540 cops/ml.

El VEB fue la causa de la fiebre en 24 casos, siendo la edad media de estos pacientes más baja que en el resto (mediana de edad de 22 años) algo esperable dada la prevalencia más elevada de primoinfección a edades más jóvenes¹⁰³

Un total de 24 pacientes presentaron serologías positivas para ambos virus, en todos estos pacientes se realizaron técnicas de RT-PCR determinándose que tan sólo 8 de ellos presentaban realmente una coinfección por ambos virus.

Sin embargo, cuando hablamos de coinfección, nos referimos a la presencia de ADN de ambos virus en muestras sanguíneas, sin poder distinguir si se trata de una verdadera coinfección o de la reactivación del VEB tras una primoinfección por CMV o al contrario. El VEB se mantiene en estado latente en el hospedador tras la primoinfección hasta en un 90% de los casos¹³⁵. En presencia de otros virus o en situaciones de stress, el VEB puede reactivarse y positivizar nuevamente serologías, detectándose además replicación viral en algunos estudios^{136, 137}.

En la práctica clínica habitual distinguir estas situaciones es una tarea difícil, cuando ambos virus pueden presentarse clínicamente de forma muy similar. La práctica técnicas moleculares se restringe a pacientes trasplantados o inmunodeprimidos donde ha demostrado ser coste-efectiva¹³⁴.

En estos casos los anticuerpos heterófilos marcar la diferencia puesto que aparecen en un 80-90% de los pacientes con mononucleosis infecciosa mayores de 10 años, son objetivables en la fase aguda de la enfermedad, rara vez persisten más de dos meses (de hecho, son un marcador excelente de la fase aguda), y no suelen aparecer en los síndromes mononucleósicos de otra causa distinta al VEB¹³⁸.

Los anticuerpos de clase IgG e IgM frente a los complejos antigénicos VCA, EA y EBNA podrían ser útiles para distinguir infección reciente de pasada e infección crónica activa por el VEB¹³⁹

En nuestro estudio no disponíamos de estos datos, por lo que quizás sería más adecuado hablar de infección por VEB y/o CMV en 8 casos, como causa de FDI.

Asociación entre la causa de la FDI y las diferentes variables epidemiológicas y clínicas de los pacientes

De los análisis realizados, el que tiene más interés desde el punto de vista asistencial es el de los grupos etiológicos, separando las patologías tratables con doxiciclina de

las viriasis. Nos interesaba conocer que factores se asocian a un grupo u a otro, puesto que, aunque se sigue recomendando el tratamiento empírico con doxiciclina para el tratamiento de la FDI, es posible que no esté indicado en un importante número de pacientes que acuden a nuestras consultas con fiebre sin focalidad de más de 7 días y que tendrán con mayor probabilidad una viriasis.

En el grupo de viriasis, tras analizar prácticamente todas las variables recogidas en el estudio, el sexo femenino y proceder de un área urbana fueron los únicos antecedentes asociados al diagnóstico. No creemos que las infecciones víricas se asocien con mayor frecuencia a las mujeres, probablemente este hecho se deba a que el resto de patologías son claramente más frecuentes en hombres.

El único síntoma asociado a viriasis fueron los escalofríos-tiritonas, lo que nos parece demasiado inespecífico para sacar ninguna conclusión.

Entre los parámetros analíticos la neutropenia por debajo de 1500/ul y la linfocitosis por superior a 4000/ul se asociaron a las infecciones por CMV y/o VEB, puntos de corte establecidos según análisis mediante curvas COR. Valores además relacionados clásicamente con las infecciones por virus.

Por último una VSG menor de 30 mm/h y una LDH > 500 UI/l también podrían apoyar la sospecha clínica inicial de viriasis.

Entre los factores asociados a patologías tratables con doxiciclina, el contacto con áreas rurales, la linfopenia por debajo de 1500/ul y la PCR < 20 mg/dl, son los más significativos desde el punto de vista estadístico.

La cifra de linfocitos, que parece elevarse en las viriasis y bajar en las zoonosis podría ser un parámetro clave para distinguir las patologías tratables con doxiciclina del resto en caso de dudas tras recoger antecedentes epidemiológicos.

Tratamiento empírico con doxiciclina del FDI

Teniendo en cuenta nuestros resultados y los cambios en el espectro etiológico ya reportados en otras series¹²¹, parece lógico replantearse el tratamiento empírico con doxiciclina en todos los casos de FDI.

En nuestra experiencia, nos parece fundamental para tomar esta decisión la recogida de una minuciosa y detallada historia clínica, que recoja todos los antecedentes epidemiológicos de interés para el diagnóstico de sospecha.

Una vez recogidos todos estos datos, el tratamiento con doxiciclina podría limitarse a aquellos pacientes que cumplan criterios clínicos de FDI y que afirmen haber tenido contacto con áreas rurales y/o animales u otros antecedentes epidemiológicos como el consumo de lácteos no higienizados. Especialmente si presentan datos compatibles en las pruebas analíticas como sería una linfopenia inferior a 1500/ul con una PCR < 20 mg/dl.

En los pacientes más jóvenes o en contacto con niños como único antecedente epidemiológico de interés para el episodio, procedentes de área urbana y con datos analíticos compatibles el tratamiento inicial debería ser sintomático, dada la alta probabilidad de que se trate de una viriasis.

Rentabilidad diagnóstica del protocolo

Gracias a los estudios centralizados previstos en el protocolo hemos sido capaces de diagnosticar un 25% de los pacientes que se enviaron sin diagnóstico etiológico.

Sin embargo, con respecto al número total de pacientes sin diagnóstico al inicio del estudio este sólo se redujo un 7%, probablemente con un número mayor de muestras enviadas, la rentabilidad hubiera sido mayor.

Si algo nos ha demostrado este estudio es las grandes limitaciones de los estudios serológicos.

VII.CONCLUSIONES

1. Las infecciones sistémicas siguen siendo la principal causa de FDI en Andalucía, principalmente las infecciones víricas y la Fiebre Q.
2. El espectro etiológico está cambiado respecto a periodos previos, con descenso de la brucelosis y de la Fiebre botonosa y aumento del número de infecciones víricas.
3. La aplicación de métodos microbiológicos no convencionales permite filiar en parte (25%) los casos que permanecen sin diagnóstico tras un estudio inicial estandarizado.
4. Entre los estudios adicionales, la serología a *B. henselae* y el VHH6 podrían ser las más rentables en la práctica clínica diaria para diagnosticar algunos casos de FDI.
5. El presente estudio no ha mostrado diferencias en la etiología de la FDI entre las diversas provincias de Andalucía, aunque los distintos tamaños muestrales limitan la solidez de esta conclusión.
6. Una adecuada historia clínica con el apoyo de diferentes parámetros analíticos, como el número de linfocitos y los valores de VSG, LDH y PCR podrían ayudar a elaborar un adecuado diagnóstico de sospecha.
7. En pacientes seleccionados, sin antecedentes epidemiológicos de interés y con el apoyo de datos clínicos y analíticos, el tratamiento con doxiciclina empírico no sería necesario.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

1. Glossary of terms for thermal physiology. Second edition. Revised by The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission). *Pflugers Arch* 1987;410(4-5):567-587.
2. Dinarello CA. Thermoregulation and the pathogenesis of fever. *Infect Dis Clin North Am* 1996;10(2):433-449.
3. Mackowiak PA. Concepts of fever. *Arch Intern Med* 1998;158(17):1870-1881.
4. Mackowiak PA, Bartlett JG, Borden EC et al. Concepts of fever: recent advances and lingering dogma. *Clin Infect Dis* 1997;25(1):119-138.
5. Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'--a review. *J Infect Public Health* 2011;4(3):108-124.
6. Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Viciano P, Pachon J. [Etiology and admission criteria in febrile syndrome without focus]. *Med Clin (Barc)* 1999;113(18):718-719.
7. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91(3):295-298.
8. Medzhitov R. Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity. *J Immunol* 2013;191(9):4473-4474.
9. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1285:97-114.
10. von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 2001;14(5):573-582.
11. Risi GF, Tomascak V. Prevention of infection in the immunocompromised host. *Am J Infect Control* 1998;26(6):594-604.
12. Donowitz GR. Fever in the compromised host. *Infect Dis Clin North Am* 1996;10(1):129-148.
13. Crum NF, Lederman ER, Wallace MR. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Medicine (Baltimore)* 2005;84(5):291-302.
14. Viscoli C, Varnier O, Machetti M. Infections in patients with febrile neutropenia: epidemiology, microbiology, and risk stratification. *Clin Infect Dis* 2005;40 Suppl 4:S240-S245.
15. de NJ, Novitzky-Basso I, Gill MJ, Marti FM, Cullen MH, Roila F. Management of febrile neutropenia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 5:v252-v256.
16. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 2011;52(4):e56-e93.
17. Leelarasamee A, Chupaprawan C, Chenchittikul M, Udompanthurat S. Etiologies of acute undifferentiated febrile illness in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2004;87(5):464-472.

18. McGowan JE, Jr., Rose RC, Jacobs NF, Schaberg DR, Haley RW. Fever in hospitalized patients. With special reference to the medical service. *Am J Med* 1987;82(3 Spec No):580-586.
19. Kaul DR, Flanders SA, Beck JM, Saint S. Brief report: incidence, etiology, risk factors, and outcome of hospital-acquired fever: a systematic, evidence-based review. *J Gen Intern Med* 2006;21(11):1184-1187.
20. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002;137(10):791-797.
21. Eroles VG, Fernandez PC, del Valle LP et al. [Fever in patients of a Service of Internal Medicine: prospective study in 204 cases]. *An Med Interna* 2006;23(2):56-61.
22. Lo E, Rezai K, Evans AT et al. Why don't they listen? Adherence to recommendations of infectious disease consultations. *Clin Infect Dis* 2004;38(9):1212-1218.
23. Yinnon AM. Whither infectious diseases consultations? Analysis of 14,005 consultations from a 5-year period. *Clin Infect Dis* 2001;33(10):1661-1667.
24. Fowler VG, Jr., Sanders LL, Sexton DJ et al. Outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia according to compliance with recommendations of infectious diseases specialists: experience with 244 patients. *Clin Infect Dis* 1998;27(3):478-486.
25. Ruiz Galiana J. Aproximacion diagnostica al enfermo con fiebre. *Medicine (Baltimore)* 1994;69:3027-3033.
26. Durack DT, Street AC. Fever of unknown origin--reexamined and redefined. *Curr Clin Top Infect Dis* 1991;11:35-51.
27. PETERSDORF RG, BEESON PB. Fever of unexplained origin: report on 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 1961;40:1-30.
28. Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Viciano P, Pachon J. [Etiology and admission criteria in febrile syndrome without focus]. *Med Clin (Barc)* 1999;113(18):718-719.
29. Rivero A AJGPea. Fiebre de Duración Intermedia: Proceso Asistencial Integrado. Consejería de Salud, Junta de Andalucía. Sevilla: Consejería de Salud, Junta de Andalucía; 2003.
30. Fever of intermediate duration in the community. A seven years study in the South of Spain. 32th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Washington DC: American Society for Microbiology; 1992.
31. Espinosa N, Canas E, Bernabeu-Wittel M, Martin A, Viciano P, Pachon J. The changing etiology of fever of intermediate duration. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28(7):416-420.
32. Petersdorf RG. Fever of unknown origin. *Ann Intern Med* 1969;70(4):864-866.

33. Cunha BA. Fever of unknown origin: clinical overview of classic and current concepts. *Infect Dis Clin North Am* 2007;21(4):867-915, vii.
34. Gelfand JA SM. Fever of unknown origin. In: New York: Churchill Livingstone, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. 1995:536-549.
35. Petersdorf RG. FUO: how it has changed in 20 years. *Hosp Pract (Off Ed)* 1985;20(4):84I-84V.
36. Hot A, Schmulewitz L, Viard JP, Lortholary O. Fever of unknown origin in HIV/AIDS patients. *Infect Dis Clin North Am* 2007;21(4):1013-32, ix.
37. Chrispal A, Boorugu H, Gopinath KG et al. Acute undifferentiated febrile illness in adult hospitalized patients: the disease spectrum and diagnostic predictors - an experience from a tertiary care hospital in South India. *Trop Doct* 2010;40(4):230-234.
38. Portillo A, Santibanez S, Garcia-Alvarez L, Palomar AM, Oteo JA. Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect* 2015;17(11-12):834-838.
39. Blanco JR, Jado I, Marin M et al. [Microbiological diagnosis of emerging bacterial pathogens: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, and *Tropheryma whipplei*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(9):573-580.
40. Mahajan SK. Rickettsial diseases. *J Assoc Physicians India* 2012;60:37-44.
41. Bernabeu-Wittel M, Pachon J, Alarcon A et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration: a 17-year study in the south of Spain. *Arch Intern Med* 1999;159(8):872-876.
42. Bernabeu-Wittel M, Segura-Porta F. [Rickettsioses]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(3):163-172.
43. Bernabeu-Wittel M, del Toro MD, Nogueras MM et al. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25(6):375-381.
44. Hernandez CM, Angel-Moreno A, Santana E et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004;10(4):740-743.
45. Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis* 1998;4(2):179-186.
46. Santibanez S, Astasio A, Villa-Real R, Camara JA, Oteo JA, Marquez FJ. Serologic study of *Rickettsia typhi* infection among the human population of southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 2:247-248.
47. Botelho-Nevers E, Raoult D. Fever of unknown origin due to rickettsioses. *Infect Dis Clin North Am* 2007;21(4):997-1011, ix.
48. Cardenosa N, Sanfeliu I, Segura F. [Microbiological diagnosis of rickettsial infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15(1):32-37.

49. Cardenosa N, Sanfeliu I, Segura F. [Microbiological diagnosis of rickettsial infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15(1):32-37.
50. Paris DH, Blacksell SD, Stenos J et al. Real-time multiplex PCR assay for detection and differentiation of rickettsiae and orientiae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102(2):186-193.
51. Higgins JA, Radulovic S, Schriefer ME, Azad AF. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):671-674.
52. Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* 2002;8(2):207-208.
53. Zavala-Velazquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sanchez-Elias RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. *Lancet* 2000;356(9235):1079-1080.
54. Marquez FJ, Muniain MA, Perez JM, Pachon J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. *Emerg Infect Dis* 2002;8(1):89-91.
55. Marquez FJ, Muniain MA, Rodriguez-Liebana JJ, del Toro MD, Bernabeu-Wittel M, Pachon AJ. Incidence and distribution pattern of *Rickettsia felis* in peridomestic fleas from Andalusia, Southeast Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:344-346.
56. Nogueras MM, Cardenosa N, Sanfeliu I, Munoz T, Font B, Segura F. Evidence of infection in humans with *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in Catalonia in the Northeast of Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:159-161.
57. Segura-Porta F, Diestre-Ortin G, Ortuno-Romero A et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur J Epidemiol* 1998;14(4):395-398.
58. Cardenosa N, Roux V, Font B, Sanfeliu I, Raoult D, Segura F. Short report: isolation and identification of two spotted fever group rickettsial strains from patients in Catalonia, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62(1):142-144.
59. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):518-553.
60. Million M, Lepidi H, Raoult D. [Q fever: current diagnosis and treatment options]. *Med Mal Infect* 2009;39(2):82-94.
61. Perez-Trallero E, Cilla G, Montes M, Saenz-Dominguez JR, Alcorta M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among slaughterhouse workers in northern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14(1):71-73.
62. Bacci S, Villumsen S, Valentiner-Branth P, Smith B, Krogfelt KA, Molbak K. Epidemiology and clinical features of human infection with *Coxiella burnetii* in Denmark during 2006-07. *Zoonoses Public Health* 2012;59(1):61-68.
63. Alarcon A, Villanueva JL, Viciano P et al. Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. *J Infect* 2003;47(2):110-116.

64. Roca B. [Q fever]. *An Med Interna* 2007;24(11):558-560.
65. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis* 2005;5(4):219-226.
66. Abril V, Ortega E, Marti-Barranco P, Pedro F, Herrera A. [Meningoencephalitis by *Coxiella burnetii*]. *Rev Neurol* 1996;24(130):722.
67. Bernard E, Carles M, Laffont C, Durant J, Dellamonica P. Guillain-Barre syndrome associated with acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(8):658-659.
68. Diaz OA, Maeztu C, Munoz JA, Reigadas R, Rodriguez T, Valdes M. Miller Fisher syndrome associated with Q fever. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53(7):615-616.
69. Mogollon MV, Anguita MP, Aguado JM et al. Q fever endocarditis in Spain. Clinical characteristics and outcome. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(2):109-116.
70. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997;3(2):213-221.
71. Brucelosis en España 1985-1988. Boletín epidemiológico semanal Ministerio de sanidad y consumo Subdirección general de información sanitaria y epidemiológica 1989;1838:173-176.
72. Fernández Merino JC. Brucelosis en Andalucía 2006. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía 2007; 2007.
73. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *Int J Infect Dis* 2010;14(6):e469-e478.
74. Al DS, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 2003;49(9-10):487-505.
75. Alvarez-Ojeda MG, Saldana-Fuentes C, Ballesteros-Elizondo MR et al. [Comparison of the tests polymerase chain reaction, serology, and blood culture with respect to sensitivity and specificity for detection of *Brucella* spp in human samples]. *Gac Med Mex* 2015;151(5):620-627.
76. Colmenero JD, Clavijo E, Morata P, Bravo MJ, Queipo-Ortuno MI. Quantitative real-time polymerase chain reaction improves conventional microbiological diagnosis in an outbreak of brucellosis due to ingestion of unpasteurized goat cheese. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71(3):294-296.
77. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis* 2010;50(2):241-246.
78. Gil R, Alvarez JL, Gomez C, Alvaro A, Gil A. Epidemiology of typhoid and paratyphoid fever hospitalizations in Spain (1997-2005). *Hum Vaccin* 2009;5(6):420-424.

79. Rodriguez FC, Solis CF, Navarro F et al. [Salmonella spp. serotypes isolated at the Hospital Universitario Reina Sofia in Cordoba during an 8-year period, 1993-2000]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20(5):208-211.
80. Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* 2005;366(9487):749-762.
81. Blanco JR, Raoult D. [Diseases produced by Bartonella]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23(5):313-319.
82. Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO et al. The louse-borne human pathogen Bartonella quintana is a genomic derivative of the zoonotic agent Bartonella henselae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9716-9721.
83. Blanco JR, Perez-Martinez L, Vallejo M, Santibanez S, Portillo A, Oteo JA. Prevalence of rickettsia felis-like and Bartonella Spp. in Ctenocephalides felis and Ctenocephalides canis from La Rioja (Northern Spain). *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:270-274.
84. Jacobs RF, Schutze GE. Bartonella henselae as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. *Clin Infect Dis* 1998;26(1):80-84.
85. Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Murano I, Takahashi H, Uchida M. Bartonella henselae infection as a cause of fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1990-1991.
86. Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between Bartonella and Chlamydia species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997;35(9):2283-2287.
87. La SB, Raoult D. Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1899-1905.
88. Aguirre E, Sainz A, Dunner S et al. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Spain. *Vet Parasitol* 2004;125(3-4):365-372.
89. Palomar AM, Portillo A, Santibanez P et al. Detection of tick-borne Anaplasma bovis, Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma centrale in Spain. *Med Vet Entomol* 2015;29(3):349-353.
90. Trends in tuberculosis incidence--United States, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56(11):245-250.
91. de CP, Hovhannesian A. Social determinants and risk factors for tuberculosis in national surveillance systems in Europe. *Public Health Action* 2015;5(3):194-201.
92. Bofinger JJ, Schlossberg D. Fever of unknown origin caused by tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am* 2007;21(4):947-62, viii.
93. Gimeno CC. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por herpesvirus. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2005.

94. Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol* 2008;14(31):4849-4860.
95. Lumbreras C, Manual O, Len O, ten Berge IJ, Sgarabotto D, Hirsch HH. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20 Suppl 7:19-26.
96. Clyde S, Crumpacker, Jie Lin Zhang. Cytomegalovirus. In: Gerald L Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th Edition ed. Vol 2. Part III. Section A. New York: Churchill Livingstone 2010. 138:1971-1988.
97. Lancini D, Faddy HM, Flower R, Hogan C. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med J Aust* 2014;201(10):578-580.
98. Manfredi R, Calza L, Chiodo F. Primary cytomegalovirus infection in otherwise healthy adults with Fever of unknown origin: a 3-year prospective survey. *Infection* 2006;34(2):87-90.
99. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets* 2011;11(5):466-474.
100. Gerna G, Lilleri D. Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: Diagnostic update. *Herpes* 2006;13(1):4-11.
101. Kusne S, Shapiro R, Fung J. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 1999;1(3):187-203.
102. Gavalda J, Vidal E, Lumbreras C. Infection prevention in solid organ transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30 Suppl 2:27-33.
103. Luzuriaga K, Sullivan JL. Infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 2010;362(21):1993-2000.
104. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001;3(1):1-10.
105. Rogo LD, Mokhtari-Azad T, Kabir MH, Rezaei F. Human parvovirus B19: a review. *Acta Virol* 2014;58(3):199-213.
106. Levy JA. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet* 1997;349(9051):558-563.
107. De BL, Naesens L, De CE. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(1):217-245.
108. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(2):313-335.
109. Fernandez-Ruiz M, Kumar D, Husain S et al. Utility of a monitoring strategy for human herpesviruses 6 and 7 viremia after liver transplantation: a randomized clinical trial. *Transplantation* 2015;99(1):106-113.

110. Montoya JG., Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii* . In: Gerald L Mandell, John E. Bennet, Raphael Dolin, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th Edition. Vol 2, Part III. Section H. ed. New York: Churchill Livingstone 2010. 279:3495-3526.
111. Eroles VG, Fernandez PC, del Valle LP et al. [Fever in patients of a Service of Internal Medicine: prospective study in 204 cases]. *An Med Interna* 2006;23(2):56-61; 1.
112. Suzuki C, Ueno T, Nishijima H et al. Fever of unknown origin. *Lancet* 2011;378(9804):1756.
113. Galanakis E, Andronikou S, Lapatsanis PD. Fever of unknown origin. *Lancet* 1997;350(9088):1401-1402.
114. Sobel J.D., Kaye D. Urinary tract infectios. In: Gerald L Mandell, John E. Bennet, Raphael Dolin, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious diseases. 7th Edition. Vol 1. Part II. Section D. ed. New York: Churchill Livingstone 2010. 69:957-986.
115. Arnow PM, Flaherty JP. Fever of unknown origin. *Lancet* 1997;350(9077):575-580.
116. Sorensen HT, Mellemkjaer L, Skriver MV et al. Fever of unknown origin and cancer: a population-based study. *Lancet Oncol* 2005;6(11):851-855.
117. Markman M. Fever of unknown origin and cancer: a clinically meaningful association. *Lancet Oncol* 2005;6(11):821-822.
118. Cunha BA, Thermidor M, Mohan S, Valsamis AS, Johnson DH. Fever of unknown origin: subacute thyroiditis versus typhoid fever. *Heart Lung* 2005;34(2):147-151.
119. Viciano P. et al. Fever of intermediate duration in the community. A seven years study in the South of Spain* . Washington DC: American Society for Microbiology; 1992.
120. www.juntadeandalucia.es/servicioandaluzdesalud/principal/documentosAcc.asp?pagina=gr_actualidad1 2015.
121. Parra RJ, Pena MA, Tomas JC et al. Clinical spectrum of fever of intermediate duration in the south of Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27(10):993-995.
122. Al DS, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 2003;49(9-10):487-505.
123. Espejo E, Gil-Diaz A, Oteo JA et al. Clinical presentation of acute Q fever in Spain: seasonal and geographical differences. *Int J Infect Dis* 2014;26:162-164.
124. Dalton MJ, Robinson LE, Cooper J, Regnery RL, Olson JG, Childs JE. Use of Bartonella antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. *Arch Intern Med* 1995;155(15):1670-1676.

125. Garcia-Garcia JA, Baquerizo R, Vargas J et al. [Prevalence of serum antibodies against Bartonella spp. in a health population from the south area of the Seville province]. Rev Clin Esp 2005;205(11):541-544.
126. Oteo JA, Brouqui P. [Ehrlichiosis and human anaplasmosis]. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005;23(6):375-380.
127. Pesquera C, Portillo A, Palomar AM, Oteo JA. Investigation of tick-borne bacteria (Rickettsia spp., Anaplasma spp., Ehrlichia spp. and Borrelia spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. Parasit Vectors 2015;8:46.
128. Garcia JC, Nunez MJ, Castro B et al. Human anaplasmosis: the first Spanish case confirmed by PCR. Ann N Y Acad Sci 2006;1078:545-547.
129. Segura F, Pons I, Pla J, Nogueras MM. Shell-vial culture and real-time PCR applied to Rickettsia typhi and Rickettsia felis detection. World J Microbiol Biotechnol 2015;31(11):1747-1754.
130. Rovey C, Raoult D. Mediterranean spotted fever. Infect Dis Clin North Am 2008;22(3):515-30, ix.
131. Miendje DY, Goubau P, Bodeus M. False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19(7):557-560.
132. Hyams C, Mabayoje DA, Copping R et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. J Med Virol 2014;86(3):478-483.
133. Mannonen L, Loginov R, Helanterä I et al. Comparison of two quantitative real-time CMV-PCR tests calibrated against the 1st WHO international standard for viral load monitoring of renal transplant patients. J Med Virol 2014;86(4):576-584.
134. Boaretti M, Sorrentino A, Zantedeschi C, Forni A, Boschiero L, Fontana R. Quantification of cytomegalovirus DNA by a fully automated real-time PCR for early diagnosis and monitoring of active viral infection in solid organ transplant recipients. J Clin Virol 2013;56(2):124-128.
135. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med 2000;343(7):481-492.
136. Coskun O, Sener K, Kilic S et al. Stress-related Epstein-Barr virus reactivation. Clin Exp Med 2010;10(1):15-20.
137. Aalto SM, Linnavuori K, Peltola H et al. Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. J Med Virol 1998;56(3):186-191.
138. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. J Clin Microbiol 2004;42(8):3381-3387.

139. Nystad TW, Myrmel H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 2007;38(4):292-297.