

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Volumen 35, Extraordinario 3, Octubre 2017

Publicación mensual



PUBLICACIÓN OFICIAL
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

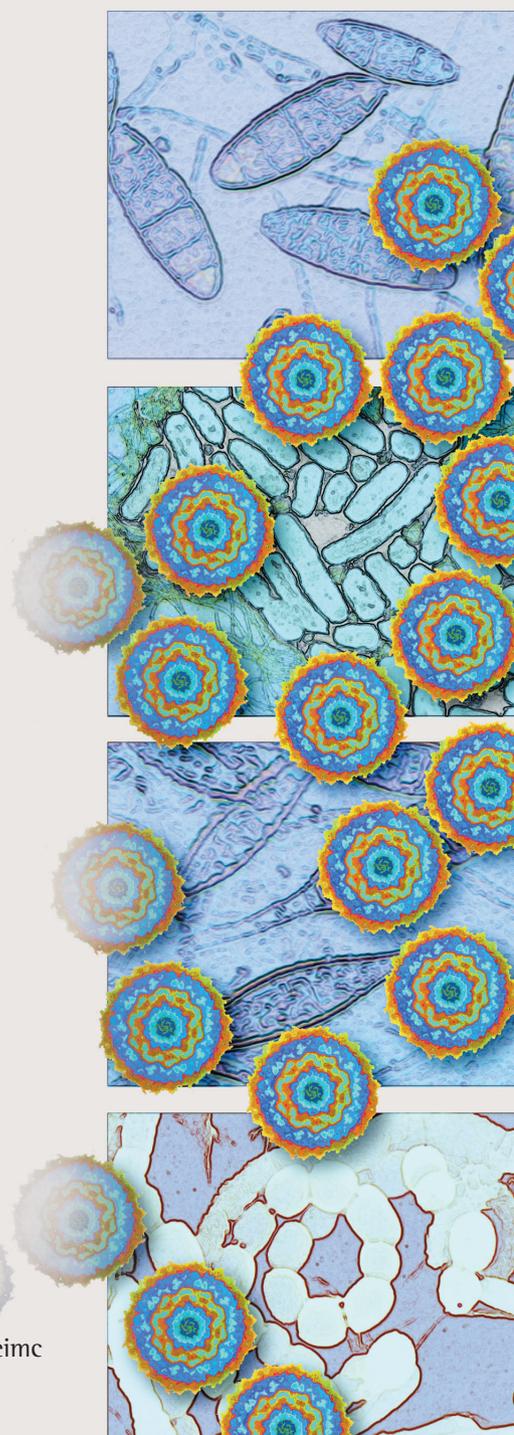
Programa de Control de Calidad
SEIMC. Año 2015

Editoras invitadas: Concepción Gimeno Cardona,
María del Remedio Guna Serrano y Nieves Orta Mira



Incluida en: Index Medicus/MEDLINE
Excerpta Medica/EMBASE
Current Contents/Clinical Medicine
ISI Alerting Services
Science Citation Index-Expanded
Journal Citation Reports
SCOPUS

www.elsevier.es/eimc



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

PUBLICACIÓN OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Volumen 35, Extraordinario 3, Octubre 2017

Programa de Control de Calidad SEIMC. Año 2015

Editoras invitadas: Concepción Gimeno Cardona, María del Remedio Guna Serrano y Nieves Orta Mira

Sumario

- | | |
|--|---|
| <p>1 Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2015
<i>E. Ruiz de Gopegui Bordes, M.R. Guna Serrano, N. Orta Mira, M. Poveda, M.R. Ovies y C. Gimeno Cardona</i></p> <p>9 Análisis de resultados del Programa de Control de Calidad Externo de carga viral del VIH-1, del VHC y del VHB. Año 2015
<i>N. Orta Mira, M.R. Guna Serrano, J.C. Latorre Martínez, E. Ruiz de Gopegui, M.R. Ovies, M. Poveda y C. Gimeno Cardona</i></p> <p>15 Hepatitis E: situación actual en España
<i>M.L. Mateos-Lindemann y M.T. Pérez-Gracia</i></p> <p>23 Parásitos e inmigración: ¿cuál es la mejor actitud?
<i>S. Hernández-Egido, M. Siller-Ruiz, M. Belhassen-García y J.L. Muñoz-Bellido</i></p> | <p>29 Bacilos gramnegativos de crecimiento lento: grupo HACEK, <i>Capnocytophaga</i> y <i>Pasteurella</i>
<i>J. Leiva y J.L. del Pozo</i></p> <p>44 Actualización en técnicas para diagnóstico microbiológico de infecciones fúngicas
<i>A. Monzón de la Torre y A. Gómez-López</i></p> <p>51 Enfermedades exantemáticas virales: aspectos clinicoepidemiológicos y de laboratorio
<i>A. Fernández García, S. Villaverde González, J.E. Echevarría Mayo, M.J. Cilleruelo Ortega y F. de Ory Manchón</i></p> <p>58 Detección de infecciones de transmisión sexual por técnicas de biología molecular
<i>C. Sabater Cabrera, M. Rodríguez Pérez, F. Vázquez y L. Otero Guerra</i></p> |
|--|---|

Este suplemento ha sido patrocinado por:



Elsevier y sus asociados no asumen responsabilidad alguna por cualquier lesión y/o daño sufridos por personas o bienes en cuestiones de responsabilidad de productos, negligencia o cualquier otra, ni por uso o aplicación de métodos, productos, instrucciones o ideas contenidos en el presente material. Dados los rápidos avances que se producen en las ciencias médicas, en particular, debe realizarse una verificación independiente de los diagnósticos y las posologías de los fármacos.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

PUBLICACIÓN OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Volume 35, Supplement 3, October 2017

SEIMC External Quality Assessment Scheme. Year 2015

Invited Editors: Concepción Gimeno Cardona, María del Remedio Guna Serrano y Nieves Orta Mira

Contents

- | | |
|--|--|
| <p>1 Analysis of the results of the SEIMC External Quality Assessment Scheme 2015
<i>E. Ruiz de Gopegui Bordes, M.R. Guna Serrano, N. Orta Mira, M. Poveda, M.R. Ovies and C. Gimeno Cardona</i></p> <p>9 Analysis of the results of the SEIMC External Quality Assessment Scheme for HIV-1, HCV and HBV viral load 2015
<i>N. Orta Mira, M.R. Guna Serrano, J.C. Latorre Martínez, E. Ruiz de Gopegui, M.R. Ovies, M. Poveda and C. Gimeno Cardona</i></p> <p>15 Hepatitis E: current state in Spain
<i>M.L. Mateos-Lindemann and M.T. Pérez-Gracia</i></p> <p>23 Parasites and immigration: what is the best approach?
<i>S. Hernández-Egido, M. Siller-Ruiz, M. Belhassen-García and J.L. Muñoz-Bellido</i></p> | <p>29 Fastidious gram-negative rods: <i>hacek</i> group, <i>capnocytophaga</i> and <i>pasteurella</i>
<i>J. Leiva and J.L. del Pozo</i></p> <p>44 Microbiological diagnosis of fungal infections: an update
<i>A. Monzón de la Torre and A. Gómez-López</i></p> <p>51 Exanthematous viral diseases: clinical and laboratory aspects
<i>A. Fernández García, S. Villaverde González, J.E. Echevarría Mayo, M.J. Cilleruelo Ortega and F. de Ory Manchón</i></p> <p>58 Detection of sexually transmitted infections using molecular biology techniques
<i>C. Sabater Cabrera, M. Rodríguez Pérez, F. Vázquez and L. Otero Guerra</i></p> |
|--|--|

This supplement has been sponsored by:



No responsibility is assumed by Elsevier, its licensors or associates for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions, or ideas contained in the material herein. Because of rapid advances in the medical sciences, in particular, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Análisis de resultados del Programa de Control de Calidad Externo SEIMC. Año 2015

Enrique Ruiz de Gopegui Bordes^{a,b,*}, M. del Remedio Guna Serrano^{a,c,d}, Nieves Orta Mira^{a,e}, Marta Poveda^a, María Rosario Ovies^a y Concepción Gimeno Cardona^{a,c,d}

^aPrograma de Control de Calidad Externo SEIMC

^bServicio de Microbiología, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, España

^cServicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, España

^dDepartamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España

^eSección de Microbiología, Hospital Francesc de Borja, Gandía, Valencia, España

RESUMEN

Palabras clave:

Control externo de calidad
Microbiología clínica

Se presenta el análisis anual de los resultados informados durante el año 2015 por los participantes inscritos en el Programa de Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), que incluye las áreas de bacteriología, serología, micología, parasitología, micobacterias, virología y microbiología molecular. Los resultados obtenidos por los centros participantes resaltan la adecuada capacitación de la gran mayoría de los laboratorios españoles de microbiología clínica. A pesar de ello, este programa muestra que es posible obtener un resultado erróneo, incluso en determinaciones de la mayor trascendencia. Una vez más, se destaca la importancia de complementar el control interno que realice cada laboratorio con estudios de intercomparación externos como los que ofrece el Programa de Control de Calidad SEIMC.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Analysis of the results of the SEIMC External Quality Assessment Scheme 2015

ABSTRACT

Keywords:

External quality assessment
Clinical microbiology

The Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) External Quality Assessment Scheme includes controls for bacteriology, serology, mycology, parasitology, mycobacteria, virology and molecular microbiology. This article presents the most relevant conclusions and lessons from the 2015 quality assessment schemes. As a whole, the results obtained in 2015 confirm the excellent skill and good technical standards found in previous editions. However, erroneous results can be obtained in clinically relevant tests. Once again, the results of this programme highlight the need to implement both internal and external controls in order to ensure the optimal quality of microbiological tests.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Los laboratorios de microbiología clínica trabajan en un entorno de creciente exigencia y responsabilidad, que requiere un alto nivel de calidad¹. Por ello, tanto las pruebas diagnósticas como los laboratorios que las realizan deben poseer una competencia técnica, con el fin de ofrecer una adecuada atención médica a los pacientes con pa-

tología infecciosa. Para asegurar la fiabilidad de los resultados emitidos, los laboratorios de microbiología clínica deben disponer de controles de calidad, tanto internos como externos, que abarquen todas las fases del proceso analítico. Estos controles de calidad permiten detectar errores, tanto sistemáticos como aleatorios, con la consiguiente posibilidad de introducir, si procede, las medidas correctoras adecuadas¹⁻⁵.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: enrique.ruiz@ssib.es (E. Ruiz de Gopegui Bordes).

La participación en programas de intercomparación externa entre diferentes laboratorios permite la obtención de diversos beneficios derivados del análisis conjunto de datos aportados por los centros participantes, así como la detección de errores o inconsistencias atribuibles a algunas metodologías o sistemas, comerciales o no, que sean el punto de partida de estudios más profundos y concluyentes^{2,5}, como se observa a lo largo de este artículo. Además, estos programas pueden aprovecharse para instaurar actividades de formación continuada que ayuden en la introducción de medidas correctoras y que repercutan en la mejora continua de la calidad. Esta ha sido una característica definitoria del Programa del Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) —CCS—⁶⁻¹⁵ y es coherente con lo indicado en la Norma UNE-EN ISO 15189¹⁶, que otorga a la formación una importancia de primer orden. En el presente número extraordinario de la revista de ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA, además del análisis general de los resultados remitidos por los participantes a lo largo del año 2015 para las áreas de serología, bacteriología trimestral y mensual, micología, parasitología, micobacteriología, virología y microbiología molecular, con sus principales conclusiones y enseñanzas, se presenta una serie de revisiones de los distintos temas sobre los que versaban los controles remitidos en este año. Las áreas de control de calidad de la carga viral de los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), de la hepatitis C (VHC) y de la hepatitis B (VHB) se presentan en un documento aparte. Se puede obtener información más detallada en el sitio web del Programa de CCS¹⁷.

Análisis de datos de los controles de serología

Durante el año 2015 se realizaron 6 controles de serología (S-1A/15, S-1B/15, S-2/15, S-3A/15, S-3B/15 y S-4/15) a 185 centros inscritos en esta área. En todas las ocasiones se remitió, junto a la muestra de suero liofilizado, una historia clínica que fundamentaba la realización de las determinaciones solicitadas. Previamente, se enviaron las muestras de suero a 2 laboratorios con experiencia en el diagnóstico serológico para la realización de estas determinaciones. Los resultados emitidos por estos 2 centros se utilizaron como valor asignado para el análisis comparativo y para la emisión de los certificados individuales de cada participante (tabla 1).

En el control S-1A/15 se remitió un suero de un paciente de 52 años que acudía a un centro de transfusiones como donante de sangre. Sin embargo, los resultados de su análisis impidieron que dicha sangre pudiera ser empleada para realizar transfusiones. Este paciente fue derivado a la consulta de medicina interna, en la que se le realizó una serología de hepatitis virales. Se solicitó a los participantes la detección del antígeno de superficie (HBsAg) y del antígeno e (HBeAg) del VHB, la detección de los anticuerpos frente a los antígenos del core, al antígeno e y frente al antígeno de superficie del VHB (anticuerpos anti-HBc total, anti-HBe y anti-HBs), los anticuerpos de tipo IgG e IgM frente al virus de la hepatitis A (VHA), y los anticuerpos de tipo IgG (inmunoglobulina G) e IgM (inmunoglobulina M) frente al virus de Epstein-Barr (VEB). De acuerdo con el valor asignado, se confirmó que el paciente estaba infectado por el VHB. Los marcadores del VHB sugerían que presentaba un patrón de hepatitis crónica en fase no replicativa (o con actividad replicativa mínima), circunstancia que comentaron bastantes laboratorios. Asimismo, respecto al VHA y VEB, el paciente había tenido una infección pasada por ambos virus (o bien se había vacunado frente al VHA), ya que los anticuerpos de la clase IgG para estos 2 virus eran positivos, mientras que los de clase IgM fueron negativos. En cuanto a los resultados de los participantes, hubo coincidencia general con los de referencia en todas las determinaciones solicitadas, con algunas discrepancias ocasionales, por lo demás sin asociación con un determinado método o equipo comercial. Como dato negativo, por su importancia clínica, hubo 2 centros que informaron erróneamente un resultado negativo para el HBsAg.

El control S-1B/15 se refería a un paciente varón de 42 años, que acudía a su médico por presentar un exantema maculopapular no pruriginoso que se extendía por el tronco y afectaba a las palmas de las manos. Como antecedente de interés relataba haber mantenido relaciones sexuales con múltiples parejas. Asimismo, había tenido una lesión genital no dolorosa que había curado de manera espontánea hacía algún tiempo. Su médico decidió extraerle una muestra de suero que fue remitida al servicio de microbiología para estudio de marcadores serológicos de sífilis y de VIH. Los 2 laboratorios expertos confirmaron la existencia de anticuerpos reagínicos y treponémicos en la muestra control, resultando positivas las pruebas de RPR (*rapid plasma reagin*, con un título de 1/2), los anticuerpos anti-*Treponema pallidum* totales y de tipo IgG, así como los anticuerpos FTA-abs de tipo IgG. Por el contrario, los anticuerpos frente al VIH de los tipos 1 y 2 (anti-VIH 1+2) fueron negativos. En cuanto a los resultados de los participantes, hubo coincidencia general con los de referencia para la detección de los diversos anticuerpos reagínicos y treponémicos, con algunas discrepancias ocasionales. Sin embargo, por su trascendencia clínica destaca que hubo 3 centros que informaron un resultado positivo para el VIH.

El control S-2/15 se correspondía con una paciente de 24 años, que acababa de llegar a nuestro país procedente de Ecuador y que se encontraba en su segundo mes de gestación. Como antecedente epidemiológico de interés, relataba que había recibido una transfusión sanguínea cuando tenía 2 años tras una intervención quirúrgica. Su médico de cabecera le realizó una extracción de sangre para control de los principales marcadores serológicos de interés en el embarazo. Así, el valor asignado fue positivo para la detección de anticuerpos de tipo IgG frente al VHC, frente al virus de la rubéola y frente a *Toxoplasma gondii*. De nuevo, hubo concordancia entre los resultados de los participantes con los del valor asignado en todas las determinaciones solicitadas, con algunas discrepancias ocasionales. Por su importancia clínica, resaltar que hubo 5 centros que informaron un resultado negativo para los anti-VHC, mientras que otros 4 laboratorios informaron de un resultado indeterminado.

El control S-3A/15 versaba sobre un varón de 43 años de edad, procedente de Ecuador, que acudía al médico de cabecera por presentar un cuadro de astenia y debilidad muscular de hacía pocos meses de evolución. Como antecedente de interés, relataba haber mantenido relaciones sexuales con varias parejas. A la exploración destacaba ligera hepatomegalia en la palpación abdominal, adenopatías laterocervicales y un tinte icterico en piel y mucosas. Su médico decidió solicitar la determinación de los distintos marcadores del VHB, así como los anticuerpos frente al VEB y al virus del herpes simple (VHS). De acuerdo con el valor asignado, se confirmó que el paciente estaba infectado por el VHB, mientras que los anticuerpos IgG e IgM frente al antígeno de la cápside viral (VCA) del VEB fueron negativos. Respecto al VHS, el paciente había tenido una infección pasada por el VHS, ya que los anticuerpos IgG frente al VHS eran positivos, mientras que los de la clase IgM fueron negativos. La gran mayoría de los laboratorios informaron correctamente los resultados para todas estas determinaciones con escasas discrepancias.

El control S3-B/15 pertenecía a una paciente de 47 años con antecedentes de consumo de drogas desde hacía más de 10 años. Acudió a su médico por presentar un cuadro de astenia, anorexia, pérdida de peso e ictericia cutaneomucosa. En la exploración, presentaba hepatomegalia, y la analítica revelaba hipertransaminasemia y anemia ferropénica. Ante estos hallazgos, el médico decidió enviar una muestra de sangre al servicio de microbiología para la determinación, entre otras, de serología frente al VHA, VHC y citomegalovirus (CMV). De acuerdo al valor asignado, los anticuerpos IgG frente al VHA y al VHC fueron positivos, mientras que los anticuerpos IgG e IgM frente al CMV fueron negativos. De nuevo, hubo concordancia entre los resultados de los participantes con el valor asignado, con algunas discrepancias ocasionales, por lo demás sin asociación con un determinado método o equipo comercial. Aun así, hay que señalar

Tabla 1
Resumen de los controles de serología y microbiología molecular del año 2015

Control	Objetivo	Resultado de referencia	Resultados coincidentes (%) ^a	Participación real (%) ^b	Utilización de laboratorio externo (%)
S-1A/15	General	–	–	95,1	13
	HBsAg	Positivo	98,8	96	
	Ac. anti-HBc totales	Positivo	98,8	97,2	
	Ac. anti-HBs	Negativo	98,1	89,8	
	Ac. anti-HBe	Positivo	98,7	86,4	
	HBeAg	Negativo	99,4	85,2	
	Ac. anti-VHA IgG	Positivo	99,3	79	
	Ac. anti-VHA IgM	Negativo	99,4	92,6	
	Ac. anti-VCA IgG	Positivo	100,0	75,6	
	Ac. anti-VCA IgM	Negativo	98,8	87	
S-1B/15	General	–	–	93	7
	Ac. reagínicos RPR/VDRL	Positivo	98,2	98,8	
	TPHA (MHA-TP)	Positivo	97,2	41,3	
	FTA-abs IgG	Positivo	100,0	15,5	
	FTA-abs IgM	Negativo	42,9	4,1	
	Ac. treponémicos totales	Positivo	99,2	74,4	
	Ac. treponémicos IgG	Positivo	100,0	12,2	
	Ac. treponémicos IgM	Negativo	95,7	13,4	
	Ac. anti-VIH 1+2	Negativo	98,2	96	
S-2/15	General	–	–	93	15,1
	Ac. anti-VHC	Positivo	94,8	95,9	
	Ac. antivirius rubéola IgG	Positivo	97,1	99,4	
	Ac. antivirius rubéola IgM	Negativo	99,3	77,3	
	Ac. anti- <i>Toxoplasma</i> IgG	Positivo	99,4	99,4	
	Ac. anti- <i>Toxoplasma</i> IgM	Negativo	100,0	96,5	
S-3A/15	General	–	–	95,1	15,8
	HBsAg	Positivo	99,4	96	
	Ac. anti-HBc totales	Positivo	99,4	94,9	
	Ac. anti-HBs	Negativo	100,0	90,4	
	Ac. anti-HBe	Positivo	97,3	85,2	
	HBeAg	Negativo	100,0	84,1	
	Ac. anti-VCA IgG	Negativo	17,3	79	
	Ac. anti-VCA IgM	Negativo	100,0	88,6	
	Ac. anti-VHS 1+2 IgG	Positivo	96,9	54,6	
	Ac. anti-VHS 1+2 IgM	Negativo	100,0	58,5	
S-3B/15	General	–	–	93,5	12,1
	Ac. anti-VHA IgG	Positivo	99,3	77,5	
	Ac. anti-VHA IgM	Negativo	100,0	93,6	
	Ac. anti-VHC	Positivo	94,2	96,5	
	Ac. anti-CMV IgG	Negativo	97,6	94,8	

(Continúa)

Tabla 1
Resumen de los controles de serología y microbiología molecular del año 2015 (cont.)

Control	Objetivo	Resultado de referencia	Resultados coincidentes (%) ^a	Participación real (%) ^b	Utilización de laboratorio externo (%)
S-4/15	Ac. anti-CMV IgM	Negativo	98,2	96,5	25
	General	-	-	90,8	
	Ac. anti-VIH 1+2		99,4	98,2	
BM-1/15	Ac. anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> totales	Negativo	99,5	77,4	8,6
		Positivo			
BM-1/15	ADN virus varicela-zóster	Positivo	100,0	87,1	8,6
BM-2/15	ARN virus respiratorio sincitial	Positivo	98,7	76,3	2,8

Ac.: anticuerpos; Ag: antígeno; CMV: citomegalovirus; IgG: inmunoglobulina G; IgM: inmunoglobulina M; VCA: antígeno de la cápside viral; VHA: virus de la hepatitis A; VHC: virus de la hepatitis C; VHS: virus del herpes simple; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

^aCon el laboratorio de referencia.

^bPorcentaje de participantes que remiten un resultado valorable sobre el total de inscritos (general) o sobre los que llevan a cabo una determinada prueba (determinaciones individuales).

^cPorcentaje de participantes que requieren el soporte técnico parcial o total de un laboratorio externo.

lar, por su importancia clínica, los 5 centros que obtuvieron un resultado negativo para los anti-VHC, mientras que otros 5 centros informaron un resultado indeterminado. Por otro lado, cabe destacar que solo el 37,6% de los participantes confirmaron el resultado positivo obtenido del VHC debido a que, en parte, en bastantes ocasiones los participantes realizaban la confirmación en una segunda muestra de suero y así lo hicieron constar en sus comentarios.

Por último, el control S-4/15 trataba de un paciente varón de 35 años, inmigrante procedente de Bolivia, que comentaba a su médico de cabecera haber notado una pérdida ponderal de unos "3 kg" en los 2 últimos meses, junto a astenia y debilidad muscular. Asimismo, relataba haber mantenido relaciones sexuales con varias parejas en los últimos dos años. Su médico decidió realizar un estudio serológico pidiendo, entre otras, la determinación de anticuerpos frente al VIH y frente a *Trypanosoma cruzi*. El valor asignado fue positivo para la detección de los anticuerpos totales y del tipo IgG frente a *T. cruzi*, mientras que fue negativo para la de anticuerpos frente al VIH. Todos los centros informaron correctamente la serología de *T. cruzi* como positiva, con la excepción de un participante que informó un resultado indeterminado. Respecto al VIH, destaca por su importancia clínica que hubo un centro que informó de un resultado positivo.

La participación real fue superior al 90% en los 6 controles remitidos, mientras que el uso de soporte externo (laboratorios externos) fue inferior al de otros años, con unos porcentajes comprendidos entre un 7,0 y un 25,0% (los menores se produjeron en las serología de lúes, VHB, VHC y VIH, determinaciones al alcance de la gran mayoría de los laboratorios, mientras que el mayor ocurrió en la serología de *T. cruzi*).

En resumen, el nivel de capacitación general de los laboratorios españoles se considera satisfactorio. Sin embargo, de nuevo hay que señalar que, incluso en las mejores condiciones (como el procesamiento de un control de calidad), se obtienen resultados erróneos en determinaciones críticas como HBsAg, anti-VHC y anti-VIH, por lo que los centros deben establecer un alto nivel de control mediante la validación clínica de los resultados.

Análisis de datos de los controles de bacteriología

En el año 2015 hubo 237 inscritos en el área de bacteriología (tabla 2). En el control B-1/15 se remitió una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria se había aislado procedente de un hemocultivo de una paciente de 44 años, ingresada en la unidad de cuidados intensivos (UCI), que había desarrollado una neumonía asociada a ven-

tilación mecánica. La participación real (97,1%) fue buena, superior a la de otros controles, mientras que la necesidad de un laboratorio externo fue inferior a lo habitual (3,0%). En cuanto a la identificación, la inmensa mayoría de los participantes (98,3%) identificaron correctamente el género y la especie de la cepa remitida. En el estudio de sensibilidad, hubo concordancia con el valor asignado para la mayoría de los antibióticos, a excepción de la gentamicina y la amikacina, en la que se observó discrepancia entre los diferentes centros. Ello estuvo en relación con los criterios empleados para la interpretación del antibiograma, ya que los puntos de corte del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) varían ligeramente con los del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

El control B-2/15 se refería a un cuadro de infección de herida quirúrgica por *Clostridium subterminale*. La historia clínica correspondía a la de un paciente de 69 años, diabético e hipertenso, que a las 72 h después de haber sido operado de una neoplasia rectal, sufría un empeoramiento súbito de su estado, con taquipnea, elevación de la temperatura corporal y dolor intenso en la zona de herida quirúrgica. El porcentaje de participación real (92,0%) fue similar al de los otros controles. En cuanto a la necesidad de un laboratorio externo, fue requerido por el 7,8% de los centros. Respecto a la identificación de la cepa, únicamente el 52,5% de los participantes identificaron correctamente la especie, si bien el 88,2% de los laboratorios informaron correctamente la cepa dentro del género *Clostridium* (porcentaje de identificaciones consideradas como aceptables por el Programa de CCS). En el estudio de sensibilidad, los participantes mostraron unos resultados concordantes con el valor asignado.

En el control B-3/15 se envió una cepa de *Enterococcus cecorum* aislada en hemocultivos de un paciente de 65 años, con sospecha de colangitis aguda. En esta ocasión, el porcentaje de respuestas acertadas en la identificación fue algo bajo, del 78,8%. Ello se debe a que esta especie no se encuentra en la base de datos de algunos sistemas comerciales de identificación, por lo que ofrecía una mayor dificultad. Aun así, un 86,8% de los participantes informaron correctamente esta cepa dentro del género *Enterococcus* (porcentaje de respuestas consideradas como aceptables por el Programa). En consecuencia con la dificultad en la identificación, el porcentaje de participación real fue el más bajo de los 4 controles anuales (89,9%), mientras que el porcentaje de utilización de un laboratorio externo fue el más alto de estos (11,7%). Respecto al estudio de sensibilidad, existió concordancia general con el valor asignado, con algunas discrepancias anecdóticas.

Finalmente, en el control B-4/15 se remitió una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una betalactamasa AmpC plasmídica in-

ducible con afectación de carbapenemas por pérdida de permeabilidad. Se había aislado a partir de las secreciones bronquiales de un varón de 57 años, ingresado en UCI, que desarrolló una neumonía asociada a ventilación mecánica. Los porcentajes de participación (91,1%) y de utilización de laboratorio externo (6,4%) fueron relativamente buenos, mientras que la práctica totalidad de los participantes (el 99,5%) llegaron a la identificación de especie. Con todo, el objetivo principal de este control no era la identificación, sino evidenciar la capacidad de los participantes para detectar, o al menos sospechar, que la cepa problema era productora de una AmpC, característica que informaron el 53,7% de ellos. Respecto a otros mecanismos de resistencia, la producción de BLEE (betalactamasa de espectro extendido) fue informada por el 26,4% de los participantes, la pérdida de porinas por el 10,7%, mientras que un 12,0% de estos comentaron erróneamente la posibilidad de que dicha cepa fuera productora de una carbapenemasa.

En resumen, los participantes han mostrado un buen nivel de capacitación y competencia. Respecto a los controles de las cepas de *C. subterminale* y *E. cecorum*, con un mayor nivel de dificultad diagnóstica, si bien los porcentajes de identificación de especie han sido más bajos que en otros controles, la gran mayoría de los centros informaron correctamente dichas cepas dentro de su género respectivo. Asimismo, la participación en estos 4 controles ha sido alta, superior al 89%.

Análisis de datos de los controles de micología

Durante el año 2015 se realizaron 2 envíos a los 209 centros inscritos (tabla 2). En el primero de ellos (M-1/15), se remitía un hongo filamentoso, que fue identificado por los 2 laboratorios expertos consultados (valor asignado) como *Fusarium solani*. Este hongo había sido aislado a partir de hemocultivos de un paciente de 53 años, diagnosticado de una leucemia mieloide aguda, que se encontraba en tratamiento quimioterápico. Presentó fiebre y múltiples lesiones eritematovioláceas que se extendían por miembros inferiores, tronco y miembros superiores. El índice de participación fue bueno (90,0%), similar a los de otros controles de micología. Respecto a la identificación, el porcentaje de centros que informaron esta especie fue bajo (42,9%), si bien, en conjunto, un 87,3% de los centros encuadraron correctamente el hongo dentro del género *Fusarium* (porcentaje de respuestas aceptables por parte del Programa). Las características macroscópicas de la cepa junto con el estudio microscópico con azul de lactofenol fueron los métodos más usados para la identificación por la práctica totalidad de los participantes.

El segundo envío (M-2/15) contenía una cepa liofilizada de *Candida krusei*. Esta levadura se había aislado en la punta del catéter y en varios hemocultivos de una paciente de 59 años ingresada en UCI, que había recibido tratamiento quimioterápico por una leucemia. El índice de participación fue similar a otros controles (90,0%), mientras

Tabla 2
Resumen de los resultados obtenidos en otros controles del año 2015

Control	Identificación	Identificación coincidente (%) ^a	Participación (%) ^b	Uso de laboratorio externo (%) ^c	Observaciones
<i>Bacteriología</i>					
B-1/15	Neumonía asociada a ventilación mecánica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98,3	97,1	3,0	Cepa multirresistente
B-2/15	Infección herida por <i>Clostridium subterminale</i>	52,5	92,0	7,8	
B-3/15	Colangitis por <i>Enterococcus cecorum</i>	78,8	89,9	11,7	
B-4/15	Neumonía asociada a ventilación mecánica por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	99,5	91,1	6,4	Cepa productora de AmpC
<i>Micología</i>					
M-1/15	Fungemia por <i>Fusarium solani</i>	42,9	90,0	4,2	
M-2/15	Sepsis por <i>Candida krusei</i>	98,0	90,0	9,0	
<i>Parasitología</i>					
P-1/15	Diarrea por <i>Giardia intestinalis</i> (<i>Giardia lamblia</i>)	97,5	94,4	0,0	
P-2/15	Infección por <i>Loa loa</i>	54,5	94,0	0,5	
<i>Micobacterias</i>					
MB-1/15	Infección respiratoria por <i>Mycobacterium gordonae</i>	95,8	89,6	19,0	
MB-2/15	Infección de herida por <i>Mycobacterium marinum</i>	92,6	89,6	13,7	
MB-3/15	Absceso cutáneo por <i>Mycobacterium abscessus</i>	73,1	87,7	18,3	
MB-4/15	Infección respiratoria por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	94,5	84,9	12,2	
<i>Virología</i>					
V-1/15	Neumonía por virus influenza A	98,8	92,5	2,3	
V-2/15	Diarrea por rotavirus	97,7	94,6	0,0	

^aCon el laboratorio de referencia.

^bPorcentaje de participantes que remiten un resultado valorable sobre el total de inscritos.

^cPorcentaje de participantes que requieren el soporte técnico parcial o total de un laboratorio externo.

que el 98,0% de los participantes identificaron correctamente la levadura. Este porcentaje tan alto demuestra de nuevo el buen rendimiento de los métodos comerciales de identificación utilizados por los participantes, mayoritariamente galerías de pruebas bioquímicas o espectrometría de masas, acompañadas en muchas ocasiones por medios de agar cromogénicos. El antifungigrama fue realizado por el 84,2% de los laboratorios que identificaron correctamente la especie, porcentaje similar a otros controles de levaduras recientes.

A modo de conclusión, estos resultados muestran una buena capacitación de los laboratorios participantes en la identificación de las levaduras más frecuentes. Respecto al hongo filamentoso, si bien el porcentaje de centros que han identificado la especie ha sido bajo, la mayor parte de las respuestas remitidas se informaron correctamente dentro del género *Fusarium*.

Análisis de datos de los controles de parasitología

Durante 2015 se realizaron 2 envíos a los 215 laboratorios inscritos en esta área (tabla 2). En el primero de ellos (P-1/15) se remitió un concentrado de heces en el que los laboratorios expertos detectaron, mediante examen microscópico de las heces tras concentración, un moderado contenido de quistes de *Giardia intestinalis* (*Giardia lamblia*/*Giardia duodenalis*), junto con una escasa cantidad de quistes de *Entamoeba coli*. El índice de participación fue del 94,4%, similar al de otros controles de parasitología, mientras que ningún centro participante requirió ayuda de un laboratorio externo. Como cabría esperar, los parásitos más frecuentemente informados fueron *G. intestinalis* (97,5% de los participantes), seguido de *E. coli* (89,8%). El Programa de CCS aceptó como respuestas óptimas las de los centros que identificaron *G. intestinalis* junto con *E. coli*, y como respuestas aceptables los centros que incluían la identificación *G. intestinalis*, ya que era el parásito más abundante y responsable del cuadro clínico; por lo que el porcentaje de aciertos fue del 97,5%.

En el segundo control (P-2/15) se remitió a los participantes un portaobjetos con una extensión sanguínea teñida con Giemsa. La muestra pertenecía a un paciente español de 69 años, con una eosinofilia de larga evolución. Relataba que, por motivos de trabajo, había vivido durante varios años en Perú y Guinea Ecuatorial. Como única sintomatología refería un prurito cutáneo intenso. El valor asignado se obtuvo mediante examen microscópico de la extensión sanguínea, informándose parasitación por *Loa loa*. El índice de participación real fue del 94,0%, similar al de otros controles, mientras que tan solo se requirió ayuda de un laboratorio externo en el 0,5% de las ocasiones. A efectos de comparación, el Programa de CCS aceptó como respuesta óptima la identificación de *Loa loa*, y como respuestas aceptables la observación de alguna microfilaria. Así, si bien solo el 54,5% de los participantes informó explícitamente la presencia de *Loa loa*, el porcentaje de respuestas que se consideraron aceptables alcanzó el 98,2%.

En general, se puede concluir que los participantes del CCS presentan muy buenos resultados en la identificación parasitológica, lo que confirma su adecuada capacitación diagnóstica, situación que viene avalada por la escasa necesidad de utilización de un laboratorio externo y por los altos porcentajes de diagnóstico correctos.

Análisis de datos de los controles de micobacterias

Durante el año 2015 se remitieron 4 controles a los 106 laboratorios inscritos en el área de micobacteriología (tabla 2). El primero de ellos (MB-1/15) contenía una cepa identificada como *Mycobacterium gordonae*. Había sido aislada a partir del esputo de un paciente de 82 años que presentaba un cuadro de tos crónica y disnea de varios meses de evolución. El porcentaje de participación fue del 89,6%, mientras que la necesidad de recurrir a un laboratorio externo fue del 19,0%, porcentajes similares a los de otros controles con micobacterias no tuberculosas. La mayoría de los laboratorios (95,8%) identi-

caron correctamente el género y la especie. Respecto a los métodos usados para la identificación, la mayoría de los participantes emplearon métodos moleculares, como la hibridación inversa (66,3% de los centros) y las sondas moleculares (17,9%). El estudio de sensibilidad solo fue realizado por el 13,7% de los participantes, ya que muchos de los centros comentaron que esta micobacteria se consideraba un contaminante, por lo que no procedía hacer el estudio de sensibilidad.

En el control MB-2/15 se remitió una cepa identificada por el centro de referencia como *Mycobacterium marinum*. Se había detectado a partir de una biopsia de un nódulo situado en el dorso del pie de un paciente de 24 años. Esta lesión se había producido tras un traumatismo con una roca mientras estaba practicando deportes acuáticos. Los porcentajes de participación (89,6%) y de utilización de laboratorio externo (13,7%) fueron similares al de los últimos controles de micobacterias. El Programa CCS aceptó únicamente como válida la identificación *M. marinum*, especie informada por gran parte de los participantes (92,6%). La mayoría de los centros que identificaron correctamente esta especie habían realizado algún método molecular (mayoritariamente hibridación inversa), o bien espectrometría de masas. En cuanto al estudio de sensibilidad, fue realizado tan solo por el 28,4% de los participantes. La técnica más empleada fue la microdilución, informada por el 51,9% de las respuestas con antibiograma. Se observó coincidencia entre los laboratorios participantes con el valor asignado de referencia en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a la amikacina, claritromicina, rifampicina, etambutol y moxifloxacino y, en menor porcentaje, también para el ciprofloxacino y la doxiciclina. Sin embargo, en el caso del cotrimoxazol, un 50,0% de los centros aportaron un resultado resistente, discrepante con el del valor asignado, sin asociación con ningún método o marca en concreto.

En el control MB-3/15 se remitió una cepa de *Mycobacterium abscessus*. Había sido aislada a partir de un exudado de herida de un varón de 57 años, albañil de profesión, que acudía a su médico por presentar unas lesiones abscesificadas en el dorso de la mano derecha de 10 días de evolución. Los porcentajes de participación (87,7%) y del uso de un laboratorio externo (18,3%) fueron similares a los de otros controles. El Programa CCS consideró como óptima la identificación de especie *M. abscessus*, y como aceptables las identificaciones *Mycobacterium chelonae/abscessus* y *M. abscessus/Mycobacterium immunogenum*, por la elevada similitud genética que presentan entre sí. Un porcentaje alto de los centros (73,1%) respondió correctamente *M. abscessus*, otro 11,8% informó *M. abscessus/immunogenum* y otro 4,3% *M. chelonae/abscessus*, con lo que el porcentaje de respuestas aceptables fue del 89,2%. Para la identificación, en un 62% de los casos se empleó la hibridación inversa y en un 22,6% la espectrometría de masas. El estudio de sensibilidad fue realizado por algo más de la mitad de los centros (55,9%), siendo las tiras de gradiente de concentración el método más empleado (el 46,2% de las respuestas con antibiograma). Los resultados obtenidos por los participantes para la doxiciclina, amikacina, cotrimoxazol, moxifloxacino y claritromicina mostraron unos porcentajes de concordancia con el del valor asignado muy elevados. Sin embargo, se produjeron algunas discrepancias para linezolid, debido a variaciones en 1 o 2 diluciones de la cepa, sin asociación con ningún método o marca en concreto.

Respecto al control MB-4/15, se remitió una cepa identificada como *Mycobacterium tuberculosis*. Procedía de un esputo de un paciente de 32 años, que presentaba desde hacía 1 mes y medio un cuadro de astenia, tos escasamente productiva y febrícula vespertina. El porcentaje de participación (84,9%) fue similar al de otros controles, mientras que la necesidad de recurrir a un laboratorio externo fue menor (12,2%), al tratarse de una micobacteria tuberculosa. Desde el Programa, se consideró como óptima la identificación de especie *M. tuberculosis* y como aceptables el complejo *M. tuberculosis* y *M. tuberculosis/Mycobacterium canetti*. Así, el 45,6% de los centros informó *M. tuberculosis*, otro 42,2% respondió complejo *M. tuberculosis* y un 6,7% contestó *M. tuberculosis/M. canetti*, por lo que el porcen-

taje de acierto global fue del 94,5%. Para la identificación se utilizaron, en la amplia mayoría de los casos, los métodos moleculares como la hibridación inversa (58,9% de los centros), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (21,1%) y las sondas moleculares (17,8%). Respecto a la inmunocromatografía que detecta el complejo *M. tuberculosis*, fue empleada por el 30,0% de los centros; si bien en todos los casos se obtuvo un resultado negativo. Ello se debía a que, probablemente, la cepa presentaba una delección o mutación en el gen codificante de la proteína MPT64 del complejo *M. tuberculosis*. En cuanto al estudio de sensibilidad, fue realizado por el 75,6% de los centros, predominando la dilución en medio líquido (82,4% de las respuestas con antibiograma). La concordancia en el estudio de sensibilidad entre las respuestas de los participantes respecto al del valor asignado fue muy elevada, con porcentajes superiores al 94%.

Análisis de datos del control de microbiología molecular

En el año 2015 se realizaron 2 envíos de microbiología molecular (tabla 1). En el primer control (BM-1/15) se remitió una alícuota de exudado de vesícula cutánea en medio de transporte de virus. La muestra procedía de una mujer de 72 años en tratamiento con metotrexato por una artropatía psoriásica, que presentó una erupción vesiculosa en zona lumbar unilateral que se irradiaba en cinturón hacia hipogastrio. Se solicitó a los participantes la detección en esta muestra del genoma del virus varicela-zóster (VVZ), prueba que fue positiva por el centro experto empleado para la obtención del valor de referencia (valor asignado) mediante una PCR a tiempo real. En este primer control se enviaron un total de 93 muestras, aportando resultados valorables el 87,1% de los centros. Todos los que respondieron al control (100,0%) detectaron el genoma del VVZ. El método empleado con mayor frecuencia fue la PCR a tiempo real (91,4%), con un predominio de los reactivos RealCycler® de Progenie.

Respecto al segundo control (BM-2/15), se envió a los participantes una alícuota con una muestra de aspirado nasofaríngeo que contenía genoma del virus respiratorio sincitial (VRS). La muestra procedía de una niña de 9 meses con un cuadro gripal. Se remitieron 91 muestras a los distintos laboratorios participantes, de los cuales 71 (76,3%) aportaron resultados valorables. En total se analizaron 74 resultados, de los cuales todos excepto uno (98,7%) fueron positivos

para la detección del genoma del VRS. En cuanto a los métodos y marcas empleados, hubo también un predominio de la PCR a tiempo real (79,7%), especialmente de los equipos GeneXpert® de Cepheid, seguido del Anyplex™ de Seegene.

Análisis de datos del control de virología

En 2015 se realizaron 2 envíos de virología. El primer control (V-1/15) consistía en una muestra de exudado nasofaríngeo que procedía de un varón de 87 años con dificultad respiratoria, fiebre de 38,5 °C, tos productiva, rinorrea y artromialgias. Se recogió una muestra de exudado nasofaríngeo que fue remitida al servicio de microbiología para la detección del virus influenza A y B. El laboratorio experto detectó, mediante una PCR a tiempo real múltiple, la presencia del virus Influenza A. La muestra fue remitida a los 93 centros inscritos, de los que 86 (92,5%) emitieron hoja de respuesta con datos evaluables. Todos los centros excepto uno (el 98,8%) detectaron el virus Influenza A en la muestra. Respecto a los métodos empleados, la mayoría de las determinaciones (73,0%) se realizaron mediante PCR a tiempo real.

En el segundo control (V-2/15) se remitió una muestra de heces procedente de un niño de 2 años que presentaba un cuadro de diarrea de 36 h de evolución, con características clínicas que sugerían una etiología viral. Así lo confirmó el laboratorio experto, que detectó, tanto por inmunocromatografía como por PCR a tiempo real, la presencia de rotavirus en la muestra. La muestra se remitió a los 93 participantes, de los que 88 enviaron hoja de respuesta con resultados analizables (94,6%). Todos estos centros excepto uno (98,9%) llegaron a la identificación correcta del virus objeto del control. En cuanto a los métodos utilizados en la identificación, el 87,9% empleó una técnica rápida de inmunocromatografía.

Se puede concluir que la práctica totalidad de los centros inscritos en el control de virología están capacitados para detectar virus influenza en exudado nasofaríngeo y rotavirus en heces.

Análisis de datos de los controles de bacteriología mensual

A lo largo del año 2015 se enviaron 12 controles mensuales de bacteriología a un promedio de 180 centros inscritos. La participación media fue del 90,3%, con escasas oscilaciones (83,9-93,9%).

Tabla 3

Características y porcentajes de participación, acierto y uso de laboratorio externo en los controles de bacteriología mensual del año 2015

Control	Identificación	Acierto	Participación	Laboratorio externo	
		Identificación	Característica especial		
BX-enero-15	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	68,5	49,4	92,3	5,4
BX-febrero-15	<i>Escherichia coli</i>	99,4	NP	83,9	0,0
BX-marzo-15	<i>Streptococcus bovis/S. lutetiensis/S. infantarius</i>	88,6	NP	92,8	1,8
BX-abril-15	<i>Bacteroides ovatus</i>	61,0	NP	91,1	6,1
BX-mayo-15	<i>Alcaligenes faecalis</i>	84,3	NP	87,8	1,2
BX-junio-15	<i>Listeria ivanovii</i>	49,7	NP	89,5	4,3
BX-julio-15	<i>Yersinia enterocolitica</i>	100,0	NP	93,4	1,2
BX-agosto-15	<i>Staphylococcus aureus</i>	98,8	NP	90,6	0,0
BX-septiembre-15	<i>Hafnia alvei</i>	99,4	NP	93,4	1,2
BX-octubre-15	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	97,6	NP	93,9	1,2
BX-noviembre-15	<i>Serratia odorifera</i>	95,6	NP	88,9	0,6
BX-diciembre-15	<i>Eikenella corrodens</i>	90,2	NP	86,1	5,8

NP: no procede.

La utilización de laboratorio externo fue baja en 8 de los 12 controles, oscilando entre el 0,0 y el 1,8%. Los porcentajes más altos de uso de un laboratorio externo se constataron en los controles de abril y diciembre, en los que se remitieron respectivamente una cepa de *Bacteroides ovatus* (6,1%) y otra cepa de *Eikenella corrodens* (5,8%). Probablemente, este hecho se debe a la mayor dificultad en la identificación.

Los porcentajes de identificaciones correctas conseguidos por los participantes fueron elevados en 5 de los controles (*Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*), todos ellos con un porcentaje de acierto superior al 97,0%. Por el contrario, el menor índice de identificaciones correctas se obtuvo en el control de junio, en el que se remitió una cepa de *Listeria ivanovii*, en que el porcentaje de centros que respondieron esta especie fue bajo (49,7%), si bien, el 96,9% de los participantes encuadró correctamente la cepa dentro del género *Listeria*.

Únicamente en una ocasión, la cepa enviada presentaba una característica fenotípica especial que constituía el objetivo perseguido por el control. Se trataba del control de enero, en el que se remitió una cepa de *Enterococcus casseliflavus*. Esta especie posee el gen *vanC2* que confiere resistencia de bajo nivel a la vancomicina, característica que solamente comentaron el 49,4% de los participantes.

En resumen, los porcentajes de participación y acierto son altos para la mayoría de los controles y se confirma de nuevo que los laboratorios participantes están capacitados para los análisis bacteriológicos (tabla 3).

Conclusiones

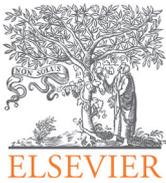
Los resultados obtenidos a lo largo de 2015 confirman la buena capacitación de la gran mayoría de los laboratorios de microbiología, en posible relación con la incorporación de profesionales bien entrenados y con conocimientos sólidos, además de con una mejora en las dotaciones técnicas de cada centro. Aun así, como en cualquier programa de control de calidad externo, se demuestra que la obtención de un resultado erróneo es un riesgo posible, con gran importancia en las determinaciones de mayor trascendencia. Una vez más, se resalta la importancia de complementar el control de calidad interno que cada laboratorio lleva a cabo con los ejercicios de intercomparación externos, como los que ofrece el Programa de Control de Calidad SEIMC⁶⁻¹⁵.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Camaró Sala ML, Catalá Cuenca V, Gimeno-Cardona C, Martínez García R, Olmos Martínez P. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2013;48.
2. Guía G-ENAC-04 Rev. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Madrid: Entidad Nacional para la Acreditación y Certificación; 2002. p. 1-18.
3. Gimeno C. Sistemas de gestión de la calidad en los laboratorios clínicos: certificación y acreditación. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21 Supl 2:17-23.
4. Gimeno C. El control de calidad y la validación en serología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;4 Supl 2:29-33.
5. Snell JJS. External quality assesment. En: Snell JJS, Brown DFJ, Roberts C, editors. *Quality assurance. Principles and practice in the microbiology laboratory*. London: Public Health Laboratory Service. 1999. p. 77-89.
6. Ruiz de Gopegui Bordes E, Guna Serrano MR, Orta Mira N, Medina González R, Ovies MR, Poveda M, et al. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34 Supl 3:1-7.
7. Ruiz de Gopegui Bordes E, Orta Mira N, Guna Serrano MR, Medina González R, Ovies MR, Poveda M, et al. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2013. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33 Supl 2:1-8.
8. Ruiz de Gopegui Bordes E, Guna Serrano MR, Orta Mira N, Ovies MR, Poveda M, Gimeno Cardona C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;32 Supl 1:1-8.
9. Ruiz de Gopegui Bordes E, Guna Serrano R, Orta Mira N, Ovies MR, Poveda M, Gimeno Cardona C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31 Supl 1:1-7.
10. Ruiz de Gopegui Bordes E, Guna Serrano R, Orta Mira N, Ovies MR, Poveda M, Gimeno Cardona C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29 Supl 5:1-7.
11. Ruiz de Gopegui Bordes E, Guna Serrano R, Orta Mira N, Ovies MR, Poveda M, Gimeno Cardona C, et al. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29 Supl 3:1-7.
12. Guna Serrano R, Orta Mira N, Ruiz de Gopegui Bordes E, Ovies M, Gimeno Cardona C, Pérez JL. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2008. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Supl 1:1-6.
13. Guna Serrano R, Orta Mira N, Ovies M, Gimeno Cardona C, Pérez JL. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2007. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Supl 13:1-7.
14. Orta Mira N, Guna Serrano MR, Orta Mira, Gimeno Cardona C, Pérez JL. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Año 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25 Supl 3:1-7.
15. Orta Mira N, Guna Serrano R, Pérez JL, Gimeno Cardona C. Programa Externo de Control de Calidad SEIMC. Análisis de resultados. Año 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24 Supl 1:1-7.
16. Norma UNE-EN ISO 15189. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia. Madrid: Asociación Española de Normalización y Certificación; 2003. p. 1-49.
17. Programa de Control de Calidad SEIMC [consultado 18-2-2017]. Disponible en: <http://www.seimc.org/controldecalidadseimc/>



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Análisis de resultados del Programa de Control de Calidad Externo de carga viral del VIH-1, del VHC y del VHB. Año 2015

Nieves Orta Mira^{a,b,*}, María del Remedio Guna Serrano^{a,c,d}, José-Carlos Latorre Martínez^a, Enrique Ruiz de Gopegui^{a,e}, María Rosario Ovies^a, Marta Poveda^a y Concepción Gimeno Cardona^{a,c,d}

^aPrograma de Control de Calidad Externo SEIMC

^bServicio de Microbiología, Hospital Francisc de Borja, Gandía, Valencia, España

^cServicio de Microbiología, Consorcio Hospital General Universitario, Valencia, España

^dDepartamento de Microbiología, Facultad de Medicina de Valencia, España

^eServicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, España

RESUMEN

Palabras clave:

Virus de la hepatitis B
Virus de la hepatitis C
Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
Carga viral
Control de calidad externo
Intercomparación

Fundamentos: Las determinaciones de la carga viral de los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), de la hepatitis C (VHC) y de la hepatitis B (VHB) son marcadores microbiológicos fundamentales para el seguimiento y control de los pacientes infectados por estos virus. Los laboratorios de microbiología disponen de herramientas que garantizan la fiabilidad de sus resultados, entre ellas se encuentran los programas de intercomparación externos, como es el Programa de Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). En el presente número se muestra el análisis de resultados del Programa de Control de Calidad SEIMC de carga viral de estos virus, incluyendo el genotipado del VHC, realizado durante el año 2015.

Métodos y resultados: En el control del VIH-1 se remitieron 5 estándares, de los que 1 (plasma humano seronegativo) no contenía el virus y los otros 4 consistían en plasma de 3 pacientes víremicos distintos en un intervalo de concentraciones entre 2-5 log₁₀ copias/ml; 2 de ellos eran idénticos, con el fin de analizar la repetibilidad. Una parte significativa de los laboratorios obtuvo de uno a varios resultados fuera de los límites aceptables (media ± 0,25 log₁₀ copias/ml), dependiendo del estándar y del método empleado, en promedio el 26,6% de los centros. La repetibilidad fue excelente, y el 97,9% de los laboratorios obtuvo resultados aceptables (Δ < 0,5 log₁₀ copias/ml). En los controles del VHC y del VHB se remitieron 2 estándares con diferente contenido del virus. La mayor parte de los participantes, un 88,5% en el caso del VHC y un 85,5% en el del VHB, obtuvo ambos resultados dentro de los límites de la media ± 1,96 DE log₁₀ UI/ml.

Conclusiones: Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la utilidad de los controles externos para asegurar la calidad de los resultados analíticos, incluyendo la fase postanalítica. Debido a la variabilidad interlaboratorio es aconsejable utilizar un mismo método y el mismo laboratorio en el seguimiento de los pacientes.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Keywords:

Hepatitis B virus
Hepatitis C virus
Human immunodeficiency virus type 1
Viral load
External quality assessment
Proficiency

Analysis of the results of the SEIMC External Quality Assessment Scheme for HIV-1, HCV and HBV viral load 2015

ABSTRACT

Background: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and hepatitis B (HBV) and C virus (HCV) viral load determinations are among the most relevant markers for the follow up of patients infected with these viruses. External quality assessment schemes are crucial to ensure the accuracy of results obtained by microbiology laboratories. This article summarises the results obtained in the 2015 SEIMC External Quality Assessment Scheme for HIV-1, HCV, and HBV viral loads.

Methods and results: In the HIV-1 programme, a total of 5 standards were sent. One standard consisted of seronegative human plasma, while the remaining four contained plasma from three different viraemic pa-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: niormi@gmail.com (N. Orta Mira).

tients, in the range of 2-5 log₁₀ copies/mL; 2 of these standards were identical, aiming to determine repeatability. A significant proportion of the laboratories (26.6% on average) obtained values outside the accepted range (mean \pm 0.25 log₁₀ copies/mL), depending on the standard and method used for quantification. Repeatability was excellent, with up to 97.9% of laboratories reporting results within the limits ($\Delta < 0.5$ log₁₀ copies/mL). The HBV and HCV programmes consisted of two standards with different viral load contents. Most of the participants, 88.5% in the case of HCV and 85.5% in the case of HBV, obtained all results within the accepted range (mean \pm 1.96 SD log₁₀ IU/mL).

Conclusions: Data from this analysis reinforce the utility of proficiency programmes to ensure the quality of the results obtained by a particular laboratory, as well as the importance of the post-analytical phase in the overall quality. Due to the notable interlaboratory variability, it is advisable to use the same method and the same laboratory for patient follow up.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

La determinación de carga viral del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), del virus de la hepatitis B (VHB) y del virus de la hepatitis C (VHC) constituye una de las funciones primordiales del laboratorio de microbiología molecular. Para ello, los laboratorios suelen utilizar sistemas comerciales, pero su eficacia diagnóstica es difícil de evaluar con la sola experiencia de cada centro. El Programa de Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) —CCS— dispone del control de calidad externo de carga viral de los virus VIH-1, VHC y VHB. Estos controles son de participación anónima y voluntaria, estando a disposición de los profesionales que desarrollan su actividad en el laboratorio e, indirectamente, de los clínicos que atienden a los pacientes infectados por esos virus. Además, el control de carga viral del VHC incluye la realización de su genotipado.

En este artículo se resumen las principales conclusiones y enseñanzas derivadas del análisis conjunto de los resultados remitidos por los participantes en la edición del año 2015.

Control de calidad del VIH-1

Características del material remitido

En la ronda correspondiente al año 2015 se remitió a los participantes 5 estándares de plasma congelado, denominados VIH-1/15, VIH-2/15, VIH-3/15, VIH-4/15 y VIH-5/15, que se habían analizado y valorado para el contenido en ARN del VIH-1. Cuatro de ellos contenían cantidades conocidas de ARN y se obtuvieron de plasma procedente de 3 pacientes distintos con viremia, buscando contenidos teóricos dentro de un intervalo de 2-5 unidades logarítmicas. Los estándares VIH-2/15 y VIH-4/15 eran idénticos, y estaban destinados, además, a analizar la repetibilidad de los resultados intralaboratorio (repetitividad de resultados en un mismo momento y bajo las mis-

mas condiciones). El estándar VIH-5/15 se preparó con plasma de un paciente seronegativo. Las muestras se analizaron, previamente a su envío, en 3 laboratorios diferentes por los métodos de reacción en cadena de la polimerasa *real time* (PCR-RT) de Roche Diagnostics (Taqman® [PCR-RT Roche]), de Abbott Diagnostics (PCR-RT Abbott) y de Siemens Diagnostics (VERSANT® kPCR), tal como se muestra en la tabla 1, quienes confirmaron los valores teóricos.

Una vez preparados los estándares, se mantuvieron congelados a -80 °C hasta su envío a los participantes, que se realizó con nieve carbónica y asegurando entregas en menos de 24 h.

Criterios de evaluación

Para demostrar la especificidad de las determinaciones se contaba con el estándar VIH-5/15 como control negativo (plasma seronegativo). En este caso, se consideraron válidos los resultados que se informaron por debajo del límite de detección de la técnica utilizada, por lo que cualquier cuantificación se correspondería con un resultado falso positivo. Para los estándares VIH-2/15 y VIH-4/15 (plasmas idénticos), se tomó como medida central la media de los valores obtenidos en ambos por todos los participantes que utilizaban un mismo método. En todos los casos, se eliminaron los valores extremos y aberrantes para el cálculo de la media¹. El criterio de aceptación se fijó en la media de los participantes para cada método $\pm 0,25$ log₁₀. Los estándares VIH-2/15 y VIH-4/15 se utilizaron también para evaluar la repetibilidad de los resultados obtenidos por cada participante. En este caso se calculó el diferencial (Δ) entre ambos valores referidos por cada centro, expresados en unidades logarítmicas². Se consideró aceptable cuando $\Delta < 0,5$ log₁₀ copias/ml, valor que tiene en cuenta tanto la variabilidad técnica²⁻⁸ como la biológica y que, en la práctica, es el que se utiliza en el seguimiento de los pacientes para considerar que se ha producido un cambio significativo de la carga viral con fines pronósticos, o para el control de la eficacia del tratamiento.

Tabla 1

Control del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1): resultados de los diferentes laboratorios (L) expertos para cada estándar y técnica^a

Estándar	PCR-RT Abbott (L-A)		kPCR Siemens (L-B)		PCR-RT TaqMan Roche (L-C)	
	Copias/ml	Log ₁₀	Copias/ml	Log ₁₀	Copias/ml	Log ₁₀
VIH-1/15	36.077	4,56	39.400	4,60	51.400	4,71
VIH-2/15	3.094	3,49	2.140	3,33	2.430	3,39
VIH-3/15	310	2,49	1.110	3,05	351	2,55
VIH-4/15	2.515	3,40	3.423	3,53	2.290	3,36
VIH-5/15	< 40	-	< 37	-	< 20	-

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.

Resultados del control VIH-1

Se envió el material de control a 100 participantes, de los que 94 remitieron respuesta (94,0%). El método más empleado fue la PCR-RT Taqman® de Roche (80,8%), seguido por la PCR-RT de Abbott (8,6%), la kPCR de Siemens (6,4%), la PCR-RT de Qiagen (2,1%) y el resto de participantes (2,1%) informaron otras técnicas distintas (NASBA-RT Nuclisens® de bioMérieux y PCR-RT *in house*). Todos los participantes emplearon técnicas de PCR-RT.

En la tabla 2 se resumen los resultados para cada método comercial. Desde el punto de vista de la especificidad, los resultados fueron muy buenos, puesto que ningún participante detectó genoma de VIH-1 en el estándar negativo (VIH-5/15). En cuanto a la variabilidad de los resultados, la mayor parte de los que se encuentran fuera del intervalo de aceptación se correspondieron con el estándar VIH-3/15 (estándar con menor carga viral). Asimismo, de la tabla 2 se puede deducir la existencia de una variabilidad intermétodo, que se confirma cuando se analizan los resultados individuales de los participantes (no se muestran), de modo que los valores obtenidos con el mismo estándar utilizando 2 métodos no son siempre comparables. Estos resultados, en su conjunto, son similares a los obtenidos en el Programa de CCS de otros años³⁻⁸.

En cuanto a los métodos de PCR-RT, el comercializado por Roche (Taqman®) obtiene un 6,6% de resultados fuera del límite de aceptación, el de Abbott un 5,0% y el de Siemens un 6,7%, todos ellos muy similares, si bien hay que tomar estos 2 últimos datos con mucha cautela pues el número de participantes que utilizaron estos métodos es muy bajo (de 8 a 6, dependiendo de la técnica).

Por otro lado, todos los centros informaron bien al menos 1 de los 5 estándares. Mientras que un 18,0% de los participantes falló en 1 de los estándares, un 4,3% en 2 y otro 4,3% en 4.

En cuanto a los resultados del estudio de repetibilidad, el 97,9% de los participantes obtuvo resultados reproducibles ($\Delta < 0,5 \log_{10}$); siendo la diferencia entre ambos valores inferior al $0,1 \log_{10}$ en la mayoría de los centros. Por lo que respecta a las excepciones, hubo 2 casos en los que los resultados no fueron reproducibles.

Comentarios y conclusiones del control VIH-1

En términos generales, los resultados aquí presentados dan una idea de la variabilidad que se puede obtener en el laboratorio en la práctica diaria y con una prueba de importante trascendencia como es la carga viral del VIH-1. Cuando se observa la variabilidad intermétodo (incluso eliminando los resultados extremos y aberrantes), esta se aproxima, y en ocasiones supera, a las 0,5 unidades logarítmicas, el valor límite usado en clínica para establecer un cambio significativo de carga viral, lo que refuerza la conveniencia de no cambiar de laboratorio en el seguimiento habitual de los pacientes.

Es importante señalar que el porcentaje de valores que se sitúa fuera del intervalo de aceptación de $\pm 0,25 \log_{10}$ copias/ml alrededor de la media para cada técnica no fue muy alto, y que la mayor experiencia se obtiene con la técnica PCR-RT Roche. El resto de métodos se emplean por pocos centros, por lo que las conclusiones obtenidas a partir del análisis de sus datos deben ser tomadas con cautela.

Como es habitual en este tipo de control, se introdujeron 2 muestras idénticas con el fin de evaluar la repetibilidad de los resultados de un determinado laboratorio. Los datos obtenidos son buenos, pese a que 2 centros no superasen la prueba.

Cuando se analiza la especificidad, los resultados también son muy buenos. No hubo ningún resultado falsamente positivo ni negativo.

A modo de resumen, los datos aquí analizados pueden considerarse aceptables y coherentes con lo esperado, a pesar de algunas desviaciones, que muestran la posibilidad de obtener resultados erróneos en cualquier laboratorio. De ahí la necesidad de introducir acciones de control interno y externo que reduzcan la aparición de dichas desviaciones, entre ellas, la participación en ejercicios de intercomparación externos²⁻¹¹, como los representados por el Programa de CCS.

Control de calidad del VHC

Características del material remitido

En el control de carga viral del VHC se remitieron 2 estándares de plasma congelado (VHC-1/15 y VHC-2/15) obtenidos de 2 pacientes

Tabla 2

Control del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1): análisis de los resultados dentro de límites según el método comercial utilizado

	Estándar				
	VIH-1/15	VIH-2/15	VIH-3/15	VIH-4/15	VIH-5/15
PCR-RT TaqMan Roche					
Media \log_{10} ^a	4,62	3,39	2,54	3,39	Indetectable
Límites aceptables ^b	4,37-4,87	3,14-3,64	2,29/2,79	3,14-3,64	-
Dentro de límites	71/76	71/76	64/76	73/76	76/76
PCR-RT Abbott					
Media \log_{10} ^a	4,66	3,40	2,54	3,40	Indetectable
Límites aceptables ^b	4,41-4,91	3,14-3,64	2,29-2,79	3,15-3,64	-
Dentro de límites	8/8	8/8	6/8	8/8	8/8
Versant® kPCR Siemens					
Media \log_{10} ^a	4,63	3,48	3,00	3,48	Indetectable
Límites aceptables ^b	4,38-4,88	3,23-3,73	2,75-3,25	3,23-3,73	-
Dentro de límites	5/6	6/6	5/6	6/6	6/6

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.^aSe calculó sobre cada método, excluyendo los valores aberrantes.^bMedia $\pm 0,25 \log_{10}$ copias/ml.

distintos con viremia por el VHC, buscando unos contenidos aproximados en UI/ml preestablecidos. Una vez realizadas las alícuotas, se conservaron a una temperatura de -80°C hasta el momento de su envío, que se hizo en nieve carbónica y con entregas inferiores a las 24 h. Ambos estándares, previamente a su envío, habían sido analizados por 2 laboratorios expertos diferentes, cada uno de los cuales empleó un método comercial diferente, confirmándose los valores teóricos aproximados (tabla 3): PCR-RT de Roche Diagnostics (Taqman® [PCR-RT Roche]) y de Abbott Diagnostics (PCR-RT Abbott). También se solicitó la realización del genotipado a todos los participantes que en sus centros dispusieran de dicha técnica. En esta ocasión, el genotipado se debía realizar con el estándar VHC-1/15 y su valor asignado fue genotipo 2, realizado por PCR-RT de Abbott (genotipo 2) e hibridación inversa INNOLiPA –Versant, Siemens– (genotipo 2a/2c). De este modo, se consideraron respuestas válidas todas las que se informaron dentro del genotipo 2 (incluyendo los diferentes subtipos).

Criterios de evaluación

Los 2 estándares se analizaron de forma cuantitativa (\log_{10} UI/ml) comparando los resultados individuales obtenidos por cada participante respecto al intervalo de confianza (IC) del 95% (media \pm 1,96 DE [desviación estándar]) de todos los que utilizaron su mismo método comercial^{12,13}. Al igual que con el control del VIH-1, para el cálculo de la media y de la DE se excluyeron los valores extremos y aberrantes¹.

Resultados del control VHC

En este control se remitieron muestras a 99 laboratorios, de los que respondieron 93 (93,9%). De ellos, 73 realizaron también el genotipado del VHC, lo que supone el 78,5% del total de participantes que enviaron hoja de respuesta.

La técnica utilizada mayoritariamente por los participantes para la realización de la carga viral fue la amplificación por PCR-RT, especialmente con el sistema comercial Taqman® de Roche (72 centros, el 77,4%). Doce participantes (12,9%) utilizaron la PCR-RT de Abbott, 3 la PCR-RT de Qiagen Diagnostics (3,2%), 5 la kPCR Versant de Siemens (5,4%) y 1 la PCR *in house* (PCR de desarrollo propio).

La tabla 4 resume los datos para el total de participantes. La variabilidad fue similar en términos de desviación respecto a la media en ambos estándares (VHC-1/15 y VHC-2/15). Cuando se comparan todos los resultados informados, independientemente de la técnica empleada, el 91,3% se encuentra dentro del intervalo de aceptación. Cabe destacar que 2 centros obtuvieron ambos valores fuera del intervalo aceptable cuando el cálculo se hizo sobre el total de participantes para todos los métodos y ninguno cuando se compararon solo con los que emplearon su misma técnica. De forma general y una vez eliminados los valores aberrantes, los resultados obtenidos fueron considerados buenos.

La tabla 5 resume los resultados comparados por cada una de las técnicas con la media de los que usan su mismo método, aunque dado el bajo número de participantes para algunas de ellas (PCR-RT Abbott y kPCR Siemens), estos resultados deben tomarse con pru-

Tabla 3

Control del virus de la hepatitis C (VHC): resultados de los laboratorios (L) expertos para cada estándar y técnica

Estándar	PCR-RT Abbott (L-A)		PCR-RT Taqman Roche (L-B)	
	UI/ml	Log ₁₀	UI/ml	Log ₁₀
VHC-1/15	212.910	5,33	145.668	5,16
VHC-2/15	3.612	3,56	4.139	3,62

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.

Tabla 4

Control del virus de la hepatitis C (VHC): resultados comparados sobre el total de participantes, con independencia de la técnica utilizada^a

	Estándar	
	VHC-1/15	VHC-2/15
Media log ₁₀	4,74	3,69
Media log ₁₀ \pm 1,96 DE	4,08-5,41	3,37-4,00
Dentro de límites	84/91 ^b	86/93

DE: desviación estándar.

^aExpresados en log₁₀ UI/ml.

^bDos centros no realizaron la determinación en este estándar.

Tabla 5

Control del virus de la hepatitis c (VHC): análisis de los resultados dentro de límites según el método comercial utilizado^a

	Estándar	
	VHC-1/15	VHC-2/15
PCR-RT TaqMan Roche		
Media log ₁₀	4,77	3,73
Límites aceptables ^b	4,20-5,34	3,55-3,92
Dentro de límites	65/70 ^c	70/72
PCR-RT Abbott		
Media log ₁₀	4,79	3,51
Límites aceptables ^b	4,19-5,40	3,42-3,60
Dentro de límites	12/12	10/12
kPCR Versant (Siemens)		
Media log ₁₀	4,09	2,68
Límites aceptables ^b	3,69-4,48	2,49-2,86
Dentro de límites	5/5	4/5

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.

^aExpresado en Log₁₀ UI/ml.

^bMedia \pm 1,96 DE.

^cDos centros no realizaron la determinación en este estándar.

dencia. En general, los valores obtenidos quedaban comprendidos dentro del margen aceptable (IC del 95% de la media de los participantes por cada técnica), destacando que debido a la técnica, PCR-RT Taqman® Roche fue la más ampliamente utilizada (72 participantes), las conclusiones que de ella se derivan son las más consistentes. Mediante esta técnica, 7 de los 142 resultados analizados (4,9%) quedaron fuera del intervalo de aceptación, de los cuales 5 se obtuvieron con el estándar VHC-1/15 y 2 con el VHC-2/15. Se detectó carga viral en todas las ocasiones en que se empleó esta técnica. Ningún centro presentó ambos estándares fuera de los límites de aceptación. Cabe destacar que, en la gran mayoría de las ocasiones, se obtienen resultados dentro del intervalo aceptable.

En cuanto al resto de métodos, resaltar que con el sistema PCR-RT de Abbott, empleado por 12 centros, de los 24 valores informados 2 estaban fuera del intervalo de aceptación, lo que supuso que el 91,7% del total de valores informados para ambos estándares se situaran dentro de dicho intervalo. Por lo que respecta a los resultados que quedaron fuera de dicho intervalo, 2 se correspondieron con el estándar VHC-1/15 y otros 2 con el VHC-2/15. Por lo que respecta a la kPCR Versant de Siemens, del total de valores informados para ambos estándares (n = 10), 1 se encontraba fuera del intervalo de aceptación.

No se muestran los datos de los métodos PCR-RT de Qiagen y la PCR *in house* porque fueron empleados por muy pocos centros.

Aunque no es posible hacer un análisis estadístico de correlación de valores, las medias obtenidas con la PCR-RT Taqman de Roche y la de Abbott fueron bastante homogéneas y, en conjunto, podríamos decir que los métodos son razonablemente comparables entre sí.

De los 93 participantes que contestaron al control, 74 realizaron el genotipado del VHC (79,6%), aunque uno de los centros no consignó finalmente el resultado por problemas durante su realización, por lo que el porcentaje real de determinaciones informadas fue del 78,5%. Todos informaron genotipo 2 o un subtipo dentro del genotipo 2, de acuerdo a las posibilidades del método empleado.

El método que se utilizó de forma mayoritaria por los participantes fue la hibridación inversa (71,2%), seguido de la PCR-RT (19,2%) y la secuenciación (9,6%). De los 47 participantes que emplearon el sistema de INNOLiPA HCV (Versant, Siemens), 45 emplearon la versión 2.

La marca comercial más empleada fue INNOLiPA HCV de Siemens (64,4%); con ella la mayoría de los genotipos informados se correspondieron con 2a/2c (85,1%). La técnica Linear Array HCV de Roche fue usada por el 6,8% de los participantes, informando todos ellos genotipo 2 (3 de ellos especificaron que emplearon el sistema Cobas® 4800). Respecto a los equipos basados en una PCR-RT, con el de Abbott y el de desarrollo propio se informó siempre genotipo 2, mientras que con el equipo de Qiagen se informó como 2a. En cuanto a la secuenciación, todos emplearon técnicas de desarrollo propio, siendo el genotipo más informado el 2c (57,1%). Los datos se muestran en la tabla 6.

Comentarios y conclusiones del control VHC

Desde el punto de vista de valoración general de los resultados, los aquí presentados deben ser considerados como buenos y coherentes con lo esperado. La mayor parte de los participantes incluyen sus resultados individuales dentro del intervalo de aceptación (IC del 95%). Además, no se detectaron resultados falsamente negativos.

Por lo que se refiere al análisis por técnicas comerciales, no es posible obtener datos concluyentes, debido a la utilización mayoritaria de un determinado método. Cabe resaltar la importancia de todas las fases del proceso diagnóstico microbiológico, incluyendo la fase preanalítica.

Control de calidad del VHB

Características del material remitido

En el control de carga viral de VHB se remitieron 2 estándares de plasma congelado (VHB-1/15 y VHB-2/15) obtenidos de 2 pacientes

distintos con viremia por el VHB, buscando unos contenidos aproximados en UI/ml preestablecidos. Una vez realizadas las alícuotas, se conservaron a una temperatura de -80 °C hasta el momento de su envío, que se hizo en nieve carbónica y con entregas inferiores a las 24 h. Ambos estándares se habían analizado, previamente a su envío, por 2 laboratorios diferentes, cada uno de los cuales empleó un método comercial diferente, confirmando los valores teóricos aproximados (tabla 7): PCR-RT de Roche Diagnostics (Taqman® [PCR-RT Roche]) y de Abbott Diagnostics (PCR-RT Abbott).

Criterios de evaluación

Los 2 estándares se analizaron de forma cuantitativa (\log_{10} UI/ml) comparando los resultados individuales obtenidos por cada participante respecto al IC del 95% (media \pm 1,96 DE) de todos los que utilizaron su mismo método comercial^{12,13}. Al igual que con el control del VIH-1 y del VHC, para el cálculo de la media y de la DE se excluyeron los valores extremos y aberrantes¹.

Resultados del control VHB

En este control se remitieron muestras a 86 laboratorios, de los que 80 respondieron (93,0%). Como sucede con los otros controles de carga viral (VIH-1 y VHC), el método informado por la gran mayoría de los participantes fue la PCR-RT por el sistema Cobas Taqman® de Roche (60 centros, 75%), seguida a distancia por la PCR-RT de Abbott (11 participantes, 13,8%) y la kPCR de Versant de Siemens (5 centros, 6,2%). Por último, 3 centros realizaron la PCR-RT de Qiagen y 1 una PCR de desarrollo propio.

La tabla 8 resume los datos para el total de participantes. La variabilidad fue algo mayor en términos de desviación respecto a la media para el estándar VHB-1/15 (estándar de mayor carga viral). Del total de resultados informados, se encontraban dentro del intervalo de aceptación alrededor del 93,1%. Cabe destacar que 4 participantes obtuvieron ambos valores fuera del intervalo aceptable (2 de ellos por posible error en la fase pre- o postanalítica). En todas las ocasiones se detecta carga viral en ambos estándares. En general, una vez eliminados los resultados aberrantes, estos fueron buenos.

La tabla 9 resume los resultados comparados por las técnicas empleadas mayoritariamente con la media de los que usan su misma técnica. No se muestran los datos de la PCR-RT de Qiagen y de la de desarrollo propio, porque se emplearon por muy pocos centros. En general, los valores obtenidos quedaban comprendidos dentro del margen aceptable (IC del 95% de la media de los participantes por cada técnica). Debido a que la técnica de PCR-RT Taqman® Roche fue la más ampliamente utilizada, las conclusiones que de ella se derivan

Tabla 6
Análisis de los resultados del genotipado del virus de la hepatitis C (VHC) (estándar VHC-1/15)

Método	Marca	Genotipo 2a/2c ^a	Genotipo 2b ^a	Genotipo 2c ^a	Genotipo 2 ^a	Genotipo 2a ^a	Total ^b
Hibridación inversa	INNOLiPA HCV v1 (Siemens)	2 (100)	-	-	-	-	2 (2,7)
	INNOLiPA HCV v2 (Siemens)	-	1 (2,2)	1 (2,2)	5 (11,1)	-	45 (61,6)
	Linear array HCV (Roche)	-	-	-	5 (100,0)	-	5 (6,8)
PCR-RT	Abbott RT HCV	-	-	-	12 (100,0)	-	12 (16,4)
	Qiagen	-	-	-	-	1 (100,0)	1 (1,4)
	Desarrollo propio	-	-	-	1 (100,0)	-	1 (1,4)
Secuenciación	Desarrollo propio	2 (28,6)	-	4 (57,1)	1 (14,3)	-	7 (9,6)
Total	-	42 (57,5)	1 (1,4)	5 (6,8)	24 (32,9)	1 (1,4)	73 (100,0)

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.

^aEntre paréntesis, % respecto a los centros que realizan su mismo método y marca.

^bEntre paréntesis, % respecto al total de centros participantes.

Tabla 7

Control del virus de la hepatitis B (VHB): resultados de los laboratorios (L) expertos para cada estándar^a

Estándar	PCR-RT Abbott (L-A)		PCR-RT Taqman Roche (L-B)	
	UI/ml	Log ₁₀	UI/ml	Log ₁₀
VHB-1/15	164.505	5,22	103.000	5,01
VHB-2/15	1.914	3,28	1.208	3,08

PCR-RT: PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.

Tabla 8

Control del virus de la hepatitis B (VHB): resultados comparados sobre el total de participantes, con independencia de la técnica utilizada^a

	Estándar	
	VHB-1/15	VHB-2/15
Media log ₁₀	5,04	3,01
Media log ₁₀ ± 1,96 DE	4,61-5,47	2,74-3,28
Dentro de límites	76/80	73/80

DE: desviación estándar.

^aExpresados en Log₁₀ UI/ml.

Tabla 9

Control del virus de la hepatitis B (VHB): análisis de los resultados dentro de límites según el método comercial utilizado^a

	Estándar	
	VHB-1/15	VHB-2/15
PCR-RT TaqMan Roche		
Media log ₁₀	4,96	3,03
Límites aceptables ^b	4,62-5,30	2,81-3,25
Dentro de límites	54/60	55/60
PCR-RT Abbott		
Media log ₁₀	5,31	2,97
Límites aceptables ^b	5,14-5,47	2,65-3,29
Dentro de límites	9/11	8/11
kPCR Versant (Siemens)		
Media log ₁₀	5,24	2,81
Límites aceptables ^b	4,96-5,52	2,69-2,93
Dentro de límites	5/5	5/5

PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa *real time*.

^aExpresado en Log₁₀ UI/ml.

^bMedia ± 1,96 DE.

son las más consistentes. Mediante esta técnica, un total de 11 resultados de los 120 informados (9,2%) quedaron fuera del intervalo de aceptación, de los cuales 6 se obtuvieron con el estándar VHB-1/15 y los otros 5 con el VHB-2/15, y en todas las ocasiones se detectó carga viral. Por otro lado, en 1 de los 3 centros que no presentaron ninguno de sus valores dentro del intervalo de aceptación, la causa de dicha desviación podría deberse a un error de transcripción de los resultados en la página *web* (fase postanalítica) o a un error de etiquetado

(fase preanalítica), ya que parecía que los resultados de ambos estándares estaban intercambiados.

En cuanto al sistema de PCR-RT de Abbott, 8 de los 11 participantes que emplean esta técnica tienen ambos valores dentro del intervalo de aceptación (72,7%). Dos de los 3 centros restantes no presentaron ningún estándar dentro de los límites de aceptación (1 por posible error pre- o postanalítico) y 1 presentó solo 1 de los valores dentro del intervalo.

Respecto al sistema de kPCR de Siemens, todos los participantes que lo emplearon obtuvieron resultados dentro de los límites de aceptación (100,0%).

Comentarios y conclusiones del control VHB

Desde el punto de vista de valoración general de los resultados, los aquí presentados se deben considerar como aceptables y coherentes con lo esperado. En todas las ocasiones se detecta carga viral y, por tanto, no se detectan resultados falsamente negativos. Por otro lado, se han detectado posibles errores de transcripción de los datos en la *web* o del etiquetado de los estándares (error fase postanalítica o fase preanalítica).

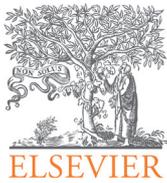
La mayor parte de los participantes incluye sus resultados individuales dentro del intervalo de aceptación (IC del 95%). No obstante, es importante que los laboratorios, de forma individual, mantengan un alto grado de vigilancia sobre la calidad de sus resultados en el día a día y, en caso necesario, introduzcan las medidas correctoras oportunas. Por lo que se refiere al análisis por técnicas comerciales, no es posible obtener datos concluyentes, debido a la utilización mayoritaria de un determinado método.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Bevington PR, Robinson DK. Data reduction and error analysis for the physical sciences. 3rd ed. Boston: McGraw-Hill; 2003.
- Niesters HGM. QCMD 2005 human immunodeficiency virus type 1 (HIVRNA05) proficiency programme. Final report. Glasgow: Quality Control for Molecular Diagnostics; 2005. Disponible en: www.qcmd.org
- Orta N, Guna MR, Latorre JC, Pérez JL, Gimeno C. Análisis de resultados del Programa de Control de Calidad Externo de carga viral del VIH-1 y del VHC, año 2006. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25 Supl 3:8-13.
- Orta Mira N, Guna Serrano MR, Latorre Martínez JC, Pérez JL, Gimeno Cardona C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2007. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26 Supl 3:8-13.
- Orta Mira N, Guna Serrano MR, Latorre Martínez JC, Pérez JL, Gimeno Cardona C. Análisis de resultados del Programa Externo de Control de Calidad SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2008. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28 Supl 1:7-11.
- Orta Mira N, Guna Serrano MR, Latorre Martínez JC, Ovies MR, Poveda M, Ruiz de Gopegui E, et al. Análisis de resultados del Programa de Control de Calidad Externo SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Supl 3:8-13.
- Orta Mira N, Guna Serrano MR, Latorre Martínez JC, Ovies MR, Poveda M, Ruiz de Gopegui E, et al. Análisis de resultados del Programa de Control de Calidad Externo SEIMC de carga viral del VIH-1 y del VHC. Año 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Supl 5:8-14.
- Documentos CCS [consultado 12-2016]. Disponible en: <http://www.seimc.org/controldecalidadseimc>
- Best SJ, Gust AP, Johnson EJM, McGavin CH, Dax EM. Quality of human virus viral load testing in Australia. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4015-20.
- Brambilla DJ, Granger S, Jennings C, Bremer JW. Multisite comparison of reproducibility and recovery from the standard and ultrasensitive Roche Amplicor HIV Monitor assays. *J Clin Microbiol.* 2001;29:1221-3.
- Muyldermans G, Debaisieux L, Franssen K, Marissens D, Miller K, Vaira D, et al. Blinded, multicenter quality control study for the quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the Belgian AIDS reference laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:213-7.
- Niesters HGM. QCMD 2005 hepatitis C virus (HCVRNA05) proficiency programme. Final report. Glasgow: Quality Control for Molecular Diagnostics; 2005. Disponible en: www.qcmd.org
- Gentili G, Cristiano K, Pisani G, Bisso GM, Miceli M, Wirz M, et al. Collaborative study for the calibration of a new Italian HCV RNA reference preparation against the international standard. *Ann Ist Super Sanita.* 2003;39:183-7.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Hepatitis E: situación actual en España

María Luísa Mateos-Lindemann^{a,*} y María Teresa Pérez-Gracia^b

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

^bÁrea de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, España

RESUMEN

Palabras clave:

Hepatitis E
Virus de la hepatitis E
Zoonosis virales
Hepatitis agudas

La infección por el virus de la hepatitis E (VHE) es una enfermedad muy prevalente en países en vías de desarrollo, llegando a causar aproximadamente 3,5 millones de casos sintomáticos y 70.000 muertes anuales, según datos recientes de la Organización Mundial de la Salud. En países desarrollados, no se conoce aún con exactitud la prevalencia de anticuerpos frente al VHE (anti-IgG-VHE) e incluso en España puede variar desde el 0,6 hasta el 12% en población general según la zona geográfica o la metodología utilizada. La hepatitis E se considera una zoonosis en países desarrollados, pero otras vías de transmisión permanecen desconocidas. Un aspecto interesante de las manifestaciones clínicas es que puede producir desde infecciones asintomáticas hasta fallo hepático fulminante y variadas manifestaciones extrahepáticas. En pacientes trasplantados e inmunodeprimidos en general, el VHE causa hepatitis crónicas en un elevado número de casos. El diagnóstico de laboratorio es fácil de realizar y se basa en estudios serológicos y la detección del ARN-VHE en sangre. El tratamiento con ribavirina da buenos resultados en la mayoría de los casos. En cuanto a la prevención, la vacuna es una buena opción en países endémicos, pero no se ha evaluado en países de baja prevalencia o en pacientes de riesgo como trasplantados hepáticos. En España se han comunicado un número importante y creciente de hepatitis E autóctonas, por lo que es imprescindible conocer las situaciones clínicas en las que se debe sospechar y confirmar su diagnóstico en el laboratorio.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Hepatitis E: current state in Spain

ABSTRACT

Keywords:

Hepatitis E
Hepatitis E virus
Viral zoonoses
Acute hepatitis

Hepatitis E virus (HEV) infection is highly prevalent in developing countries, accounting for approximately 3.5 million asymptomatic infections and 70,000 deaths annually, according to World Health Organization estimations. In developed countries, the prevalence of HEV-IgG antibodies is not fully known, and in Spain it can range from 0.6% to 12% among the general population in different geographical areas. In developed countries, hepatitis E is considered a zoonotic infection, but other routes of transmission remain unknown. An interesting aspect regarding clinical manifestations is that they can vary from asymptomatic infection to fulminant hepatitis and various extrahepatic manifestations. Moreover, HEV can cause chronic hepatitis in a large number of transplanted and immunosuppressed patients. Diagnosis is based on serological studies and detection of viral RNA in blood. Treatment with ribavirin is successful in most cases. The vaccine is a good option to prevent the infection in developing countries, but has not been evaluated in low prevalence countries or in risk groups such as liver transplant patients. In Spain, a large and growing number of autochthonous cases of hepatitis E have been reported. It is therefore essential to determine the clinical scenarios where a diagnosis of hepatitis E must be confirmed in the laboratory.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmateoslindemann@gmail.com (M.L. Mateos-Lindemann).

Introducción

El virus de la hepatitis E (VHE), perteneciente a la familia *Hepeviridae*, es la principal causa de hepatitis viral en los países en vías de desarrollo, originando aproximadamente 20 millones de infecciones y 70.000 muertes al año¹. La vía de transmisión fecal-oral es la más frecuente en áreas endémicas, pero en zonas desarrolladas donde se han comunicado numerosos casos autóctonos en estos últimos años, la hepatitis E (HE) es una zoonosis. Aun así, no es posible establecer la vía de transmisión en la mayoría de los pacientes infectados. Hay todavía muchos puntos oscuros en relación con la epidemiología, pues en algunos países hay una alta prevalencia de anti-IgG-VHE y, sin embargo, una baja incidencia de la enfermedad. La infección puede cursar de manera asintomática, producir hepatitis aguda autolimitada o hepatitis crónica en pacientes inmunodeprimidos. Cada vez se conocen más manifestaciones extrahepáticas de esta infección, especialmente las neurológicas, hasta tal punto de que el 8% de los casos de Guillain-Barré son atribuidos al VHE². El diagnóstico de la HE se basa en el cuadro clínico y, principalmente, en las pruebas de laboratorio para detectar anticuerpos IgG e IgM (anti-IgG-VHE y anti-IgM-VHE). En España, se conoce que el virus circula en aguas residuales y en otros reservorios como cerdos, mariscos, frutas y verduras. La prevalencia de anti-IgG-VHE es del 0,6 al 12% en población general, similar a la de otros países industrializados, pero parece baja en un país donde el consumo de carne de cerdo y productos derivados es importante. En los casos en los que se ha podido aislar la cepa se ha comprobado que pertenece al genotipo 3f, el predominante en la cabaña porcina y también en otros países industrializados^{3,4}. Se han comunicado gran cantidad de casos autóctonos de hepatitis agudas, crónicas en inmunodeprimidos, algún caso aislado en inmunocompetentes e incluso hepatitis fulminantes, en distintas comunidades geográficas de nuestro país⁵⁻⁸, pero desafortunadamente la HE aún no ocupa el lugar que le corresponde en el diagnóstico diferencial de los cuadros hepáticos y no se demandan las pruebas de laboratorio necesarias para conocer la incidencia real. Asimismo, se necesitan estudios epidemiológicos para esclarecer la verdadera incidencia de esta infección y algunos mecanismos de transmisión que aún permanecen desconocidos. En esta revisión se abordan los avances en diferentes aspectos de la infección por el VHE, haciendo especial referencia a la situación epidemiológica de España.

Virología

El VHE presenta un tamaño entre 32 y 34 nm, es desnudo y con simetría helicoidal. Posee una densidad de flotación en CsCl entre 1,39 y 1,40 g/ml, y un coeficiente de sedimentación de 183S⁹. El genoma del VHE tiene una longitud que varía entre 6,6 y 7,3 kb y se compone de una única hebra de ARN de polaridad positiva con 3 regiones de lectura abierta (ORF, *open reading fragments*): ORF1, ORF2 y ORF3¹⁰. El ORF1 es la zona más extensa (5 kb) y la que posee mayor heterogeneidad entre los diferentes aislados. Se localiza en la región 5' y codifica una poliproteína de aproximadamente 1.693 aminoácidos, que posteriormente dará lugar a las proteínas no estructurales involucradas en la replicación y en el procesamiento de las proteínas virales. El ORF2 está localizado en la región 3', presenta una longitud de unas 2 kb y codifica la principal proteína estructural que da lugar a la cápside viral. El ORF3 (369 pb) es la región más pequeña, y se solapa parcialmente con el ORF1 y el ORF2. Codifica una fosfoproteína que modula la actividad celular¹¹. El ARN también contiene regiones que no se traducen (UTR) en los extremos 3' y 5'. Recientemente se ha identificado otra región, denominada ORF4, a partir de un aislado de VHE perteneciente al genotipo 1, que intervendría en la replicación viral¹².

Clasificación

Existe una gran diversidad entre los diferentes aislados del VHE, aunque solo se ha identificado un serotipo¹³. Se han propuesto varias clasificaciones del VHE en genotipos y subtipos^{14,15}. En julio de 2014, el Comité Internacional de Virología Taxonómica¹⁶, reunido en Montreal, Canadá, clasificó el VHE en la familia *Hepeviridae* (tabla 1). Esta familia esta dividida en 2 géneros, el género *Orthohepevirus*, que incluye todas las cepas de VHE aisladas en mamíferos y aves, y el género *Piscihepevirus*, en el que solamente existe una cepa VHE, aislada en la trucha degollada. Dentro del género *Orthohepevirus* hay varias especies: *Orthohepevirus A*, en el que se incluyen aislados en humano, cerdo, jabalí, ciervo, mangosta, rata, conejo y camello; *Orthohepevirus B*, en el que están los aislados VHE en aves; *Orthohepevirus C*, detectados en la rata bandicota índica, la musaraña almizcle asiática, el hurón y el visón, y *Orthohepevirus D*, en el que estarían clasificados los aislados en murciélago. Dentro de la especie *Orthohepevirus A*, existen en la actualidad 5 genotipos descritos que infectan al hombre (G1, G2, G3, G4 y G7) y 2

Tabla 1
Clasificación de la familia *Hepeviridae*

Familia	Género	Especies	Genotipo	Origen	
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirus</i>	<i>Orthohepevirus A</i>	1	Humano	
			2	Humano	
			3	Humano, animal (cerdo, mangosta, conejo, ciervo, rata)	
			4	Humano, animal (cerdo)	
			5	Animal (jabalí)	
			6	Animal (jabalí)	
			7	Animal (camello), humano	
		<i>Orthohepevirus B</i>	-	Animal (aviar)	
		<i>Orthohepevirus C</i>	C1	Animal (rata bandicota, musaraña almizcle)	
			C2	Animal (hurón, visón)	
		<i>Orthohepevirus D</i>	-	Animal (murciélago)	
		<i>Piscihepevirus</i>	<i>Piscihepevirus A</i>	-	Animal (trucha degollada)

genotipos que afectan solamente a animales (G5 y G6)³. El género *Orthohepevirus C* incluye dos genotipos, el C1, en el que se incluyen los aislados en la rata bandicota índica y en la musaraña almizcle asiática, y el C2, encontrado en el hurón y el visón¹⁷.

El G1 incluye la cepa humana Birmania (prototipo) y cepas de Asia, Oriente Medio y el norte de África. El G2 consiste en una cepa humana de México (prototipo) y varias cepas aisladas en África. El G3 comprende cepas humanas y animales de Estados Unidos, Europa, Argentina, Canadá, Nueva Zelanda y Asia. El G4 incluye cepas humanas y animales identificados en Asia y Europa¹⁸. El G7 se ha aislado en camellos. Recientemente, el G7 también se ha encontrado en un paciente trasplantado hepático de Oriente Medio, que había consumido carne y leche de camello¹⁹. Estos datos apoyan la naturaleza zoonótica del G3, G4 y G7.

La cepa de VHE encontrada en la trucha degollada se ha clasificado en un género diferente, denominado *Piscihepevirus A*. Este aislado posee la misma disposición genómica que se observa en todos los aislados de la familia *Hepeviridae*, aunque existen diferencias en la secuencia de aminoácidos. Estas similitudes varían según los ORF comparados en las cepas VHE detectadas en aves, ratas y mamíferos, siendo del 42 al 49% en el ORF1, del 42 al 55% en el ORF2 y del 20 al 29% en el ORF3¹⁶.

Epidemiología

La infección por VHE se encuentra distribuida en todo el mundo, siendo Asia oriental y meridional las zonas que tienen las tasas más altas de prevalencia²⁰. Diferentes estudios han demostrado que el VHE se ha extendido a nivel mundial²¹. En la tabla 2^{4-6,34,45,69-77} se muestra la prevalencia de anticuerpos frente al VHE detectada en diversos estudios realizados en España. Los genotipos encontrados

varían dependiendo de la región geográfica. Así, el G1 (Asia central y del sur y África del norte) y el G2 (África occidental y México) son predominantes en los países en desarrollo, mientras que el G3 se encuentra sobre todo en el continente americano y Europa, y el G4 es más común en China.

Independientemente de la distribución global, la mayoría de los casos de esta enfermedad se produce en los países menos desarrollados. Así, la OMS reconoce que la HE es un importante problema de salud pública, produciéndose aproximadamente 20 millones de infecciones por hepatitis E cada año, que causan más de 3,3 millones de casos de hepatitis aguda y 70.000 muertes¹.

Formas de presentación (epidémica frente a esporádica)

La infección VHE tiene 2 formas de presentación: epidémica y/o esporádica. La forma epidémica se produce en países en vías de desarrollo y se debe, principalmente, al consumo de agua contaminada con material fecal²², tras desastres naturales o bien por hacinamiento de personas en campos para desplazados. Cuando se produce una epidemia de HE, aproximadamente entre el 1 y el 15% de la población se ve afectada, y afecta en mayor medida al sexo masculino²³. La infección por VHE está considerada como endémica en la India, Asia central, África y México. Según los Centers for Disease Control, la India es uno de los países donde el VHE es el responsable del 40% de las hepatitis agudas virales. De hecho, la primera epidemia asociada a este virus ocurrió en Nueva Delhi en 1955²⁴, y una de las más recientes se ha producido en 2014 en Biratnagar, Nepal²⁵.

En los países industrializados, la enfermedad se presenta de forma esporádica. En la mayoría de los casos se atribuía a pacientes que habían viajado a zonas endémicas²⁶⁻²⁸ o bien a casos importados por inmigrantes. Sin embargo, en los últimos años se han descrito nume-

Tabla 2
Prevalencia de virus de la hepatitis E (VHE) detectada en España

Población	Número de muestras	Prevalencia VHE			Referencia
		IgG (%)	IgM (%)	ARN (%)	
Hepatitis aguda (Cádiz)	336	8,92	7,73	2,7	71
Hepatitis aguda (Cataluña)	392	6	-	2,5	5
Hepatitis aguda (Zaragoza)	370	-	7,3	-	6
Pacientes VIH (Córdoba)	894	21,4	9,8	0,5	72
Pacientes VIH (Cataluña)	238	9	-	1,2	73
Pacientes VIH (Madrid)	448	10,4	-	-	69, 70
Pacientes VIH (Móstoles)	200	12,5	-	-	4
Pacientes VHC (Móstoles)	200	40	-	-	4
Pacientes VIH/VHC (Móstoles)	894	21,4	-	0,5	4
Donantes (Móstoles)	200	12	-	-	4
Donantes (Valencia)	99	4	-	-	34
Donantes (Cataluña)	9.998	19,96	-	0,003	45
General (Cataluña)	1.280	7,3	-	-	74
Embarazadas (Madrid)	1.040	3,6	0,67	0	75
Pacientes hemodializados (Madrid)	63	6,3	-	-	76
Inmigrantes subsaharianos (Madrid)	90	5,5	-	-	77
Personas en contacto con ganado porcino (Valencia)	113	18,6	0	0	34

Ig: inmunoglobulina; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

rosos casos autóctonos de HE. En este sentido, hay que indicar que los G3 y G4 son los responsables de estos casos autóctonos en países donde esta enfermedad no es endémica, como España, Estados Unidos y Japón, entre otros²⁹. En estos países, debido a sus buenas condiciones higienicosanitarias, la vía de transmisión no sería el agua contaminada, sino que la más probable sería el contacto con animales, sobre todo el ganado porcino, que actúan como reservorio de este virus³⁰.

Vías de transmisión

En cuanto a las vías de transmisión, existen remarcables diferencias según el área geográfica, al igual que ocurre con la distribución de los genotipos del VHE (fig. 1).

La principal vía de transmisión en países en vías de desarrollo es la fecal-oral, ya que estos países tienen deficientes condiciones higiénicas, lo que incrementa la contaminación de los alimentos y, especialmente, del agua potable²⁹. En general, la contaminación ocurre tras lluvias torrenciales, inundaciones o desastres naturales, cuando el agua de consumo se mezcla con aguas residuales de humanos y animales. Esta es la ruta de transmisión principal para los G1 y G2, que solo se transmiten entre personas.

Otras vías de transmisión de humano a humano incluyen la transmisión sexual³¹ y la transmisión vertical in útero^{32,33}. Las tasas de transmisión madre a hijo varían entre el 23,3 y el 50% según diferentes estudios, y son más frecuentes en el tercer trimestre del embarazo. En uno de estos estudios, se observó que se producían más nacimientos prematuros y un aumento de la mortalidad prenatal en el grupo de mujeres embarazadas infectadas con el VHE³³. En cuanto a la transmisión sexual, no es una ruta muy común, sin embargo, los varones homosexuales muestran una mayor prevalencia de anticuerpos VHE (20%) que la población general, lo que demuestra que esta vía puede ser viable³¹.

En los países industrializados, la HE se identifica como una enfermedad zoonótica, siendo el cerdo el reservorio principal. En estos países, la infección se puede adquirir de 2 maneras diferentes, por contacto directo con animales infectados (veterinarios y manipuladores) o bien por la ingestión de alimentos que han estado en contacto con animales infectados o heces. En este sentido, veterinarios,

personas en contacto con ganado porcino y trabajadores de mataderos han demostrado una alta prevalencia de anti-VHE^{34,35}. La infección a través del consumo de carne cruda o poco cocinada también es común en Europa y Estados Unidos, hasta el punto que algunos estudios epidemiológicos han identificado el consumo de carne de caza y porcina como un factor de riesgo para la infección por VHE^{36,37}. Asimismo es importante resaltar que los purines del ganado porcino también podrían contaminar los cultivos, así como el agua de mar. En este sentido, hay que resaltar que el consumo de marisco crudo también podría dar lugar a infección por VHE³⁸. Así, está documentado un brote de HE por consumo de marisco que tuvo lugar en 2008 durante un crucero³⁹. El concepto de HE como enfermedad transmitida por los alimentos es particularmente importante en Europa occidental, donde la cadena alimentaria es la principal fuente de infección. En España, también se ha comunicado la transmisión de este virus a un paciente a través del consumo de carne de cerdo⁴⁰.

La concienciación sobre el VHE transmitido por transfusión está aumentando exponencialmente a medida que se van identificando más casos, tanto en países industrializados como en desarrollo. La primera HE confirmada por transfusión sanguínea en un país desarrollado tuvo lugar en 2002 en Hokkaido, Japón, cuando un grupo de investigadores mostró una secuencia idéntica del VHE G4 en un donante de sangre y un paciente que había recibido esa transfusión durante una cirugía cardíaca⁴¹. Después de la identificación de otros casos con las mismas características, en Japón se empezó a realizar el cribado para el ARN-VHE de donantes de sangre que tenían valores elevados de ALT (alanina transaminasa). En Reino Unido⁴² y Francia⁴³, en 2006 y 2007, se registraron los primeros casos europeos de infecciones por VHE postransfusión. En España, recientemente se ha publicado un caso de HE aguda en un individuo inmunocompetente debido a una transfusión sanguínea⁴⁴. En otro estudio, realizado en Cataluña, en 10.000 muestras de donantes sanguíneos se detectó que 1 de cada 3.333 donaciones era ARN-VHE positivo en el momento de la donación⁴⁵ (tabla 3)⁷⁸⁻⁹⁶. Todos estos estudios muestran que cualquier producto sanguíneo (glóbulos rojos, plaquetas, plasma fresco congelado, etc.) puede transmitir el VHE, sin embargo, la carga viral requerida para producir la enfermedad, hasta el momento, es incierta⁴⁶. Y debido a esta evidencia, en algunos países, como por ejemplo Irlanda, se ha introducido en enero de 2016 el cribado VHE universal

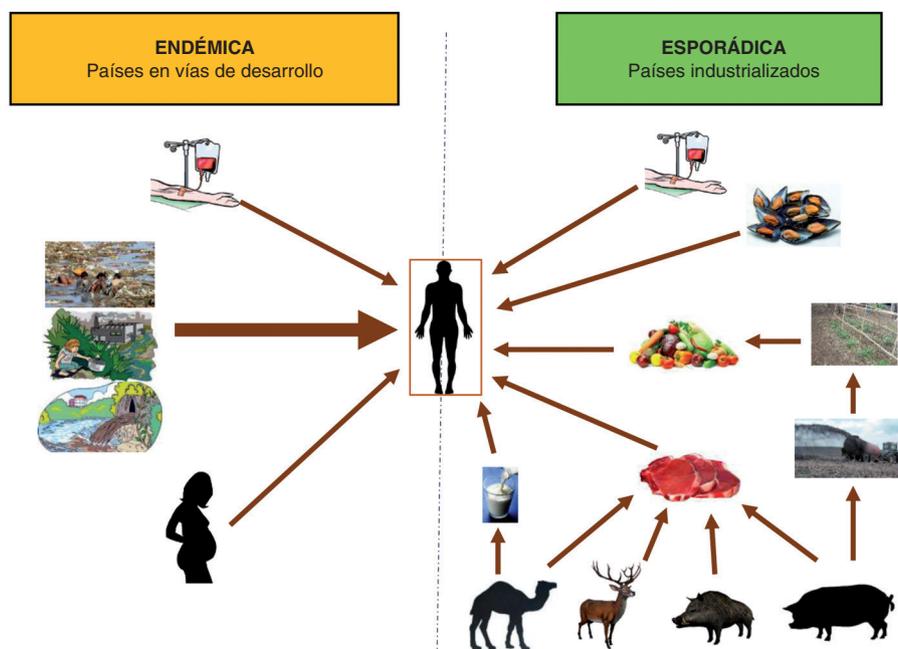


Figura 1. Vías de transmisión del virus de la hepatitis E.

Tabla 3
Tasas de viremia en donantes sanguíneos en diferentes países

Año del estudio	País	Tasa de ARN-VHE positivo en donantes sanguíneos	Referencia
2000	India	1:27	78
2004		1:67	79
2014	Países bajos	1:611	80
2013-2014		1:762	81
2013		1:1.761	82
2013		1:2.671	83
2012-2013		1:2.742	80
2014	Alemania	1:671	84
2012		1:1.240	85
2012		1:4.525	86
2007	Japón	1:745	87
2004		1:1.781	88
2005-2015		1:6.173	89
2004-2014		1:15.075	89
2013	China	1:1.790	90
2014	Francia	1:2.218	91
2015	Dinamarca	1:2.331	92
2015	Inglaterra	1:2.848	93
2013	España	1:3.333	45
2013-2014	Irlanda	1:4.997	94
2015	Austria	1:8.416	95
2012	Suecia	1:7.986	86
2015	EE. UU.	1:9.500	96
2013	Escocia	1:14.520	97

VHE: virus de la hepatitis E.

de donantes, y en Inglaterra, en marzo de este mismo año, el cribado VHE selectivo, es decir, solo en los productos sanguíneos destinados a grupos de "alto riesgo", como los inmunosuprimidos⁴⁷.

Manifestaciones clínicas

En general, no hay ningún signo clínico que diferencie la HE aguda de otras hepatitis virales e incluso de hepatitis autoinmunes, por medicamentos o cualquier otra etiología. Únicamente, hay que señalar la alta tasa de mortalidad en embarazadas en los países en vías de desarrollo, y que la hepatitis crónica y las manifestaciones extrahepáticas se han comunicado casi exclusivamente en países desarrollados⁴⁶.

Hepatitis aguda

Generalmente es autolimitada, dura aproximadamente 6-7 semanas y los síntomas son similares a otras hepatitis agudas virales. La ictericia es el signo predominante, aparece en el 40% de los casos y puede durar hasta 4 semanas. Otros síntomas frecuentes son mialgias, fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal y articular.

En los países desarrollados, es mucho más frecuente en varones que en mujeres y la edad media de los pacientes es aproximadamente de 65 años, a diferencia de lo que ocurre en las zonas en vías de desarrollo, en donde la población adulta joven es la más afectada. Se desconocen las causas, pero se cree que están relacionadas con el mecanismo de adquisición³.

Hay que resaltar que muchas hepatitis diagnosticadas como autoinmunes y por medicamentos son en realidad HE agudas, en las que no se ha sospechado el diagnóstico correcto y se hace retrospectivamente al estudiar los marcadores anti-IgG-VHE y anti-IgM-VHE⁴⁸.

Hepatitis crónica

La principal característica de la hepatitis crónica E es la persistencia del ARN-VHE o del anti-IgM-VHE en sangre más de 6 meses, aunque en la práctica se considera que, si estos marcadores no han desaparecido a los 3 meses, la infección tiene muchas probabilidades de cronificar⁴⁹.

En todos los casos de hepatitis crónica en los que se ha aislado el VHE se ha comprobado que está causada por el G3, excepto en un paciente en China, en el que se detectó G4. No se ha encontrado ningún caso de infección por G1 o G2^{50,51}.

La hepatitis crónica E se observa principalmente en trasplantados hepáticos y renales, pacientes infectados por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), pacientes hematológicos que reciben quimioterapia y, en general, en todos los individuos inmunodeprimidos. Últimamente se están observando casos en pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con fármacos inmunosupresores como los inhibidores de factor tumoral⁵². No hay que olvidar que excepcionalmente puede aparecer hepatitis crónica en inmunocompetentes, pero únicamente se han comunicado 2 casos, uno de ellos en nuestro país^{53,54}.

Hepatitis crónica en trasplantados

El primer estudio publicado de hepatitis crónica en trasplantados de hígado y riñón fue en el año 2008⁵⁵ y desde entonces se han comunicado muchos más casos, recientemente también en España⁵. La característica más importante es la alta tasa de cronicidad, aproximadamente del 60%, y la rápida evolución a fibrosis o cirrosis, por lo que se requiere un diagnóstico y tratamiento precoces. Se comienza con una disminución de la inmunosupresión y, si es necesario, se instaura un tratamiento con ribavirina.

También se ha observado una hepatitis crónica E en un niño trasplantado hepático, pero es el único caso documentado⁵⁶ hasta este momento.

Hepatitis crónica en pacientes con hepatopatía previa

Los pacientes con hepatopatía previa como esteatosis o fibrosis por alcohol tienen síntomas similares a una hepatitis aguda, pero rápidamente desembocan en descompensación hepática y encefalopatía (*acute on chronic hepatic failure*), con una mortalidad elevada cercana al 70%. En estos casos, el VHE se podría considerar como oportunista provocando un fallo hepático agudo. Se cree que es debido a una respuesta inmunológica más severa a la infección por VHE³.

Manifestaciones extrahepáticas

Se han descrito varias manifestaciones extrahepáticas en pacientes con infección por el VHE, principalmente hematológicas y neurológicas. Entre estas últimas destacan la parálisis de Bell, la meningoencefalitis, las polirradiculopatías y, sobre todo, el síndrome de Guillain-Barré. Últimamente se ha publicado un estudio en el que se concluye que el 8% de estos pacientes tienen o han tenido recientemente una infección aguda por el VHE². En cuanto a las manifestaciones hematológicas aparecen varias semanas o varios meses después de la infección y cursan como trombocitopenia, anemia hemolítica o púrpura de Henoch-Schoenlein. Recientemente se ha descrito en España el primer caso de agranulocitosis asociada al VHE G3⁵.

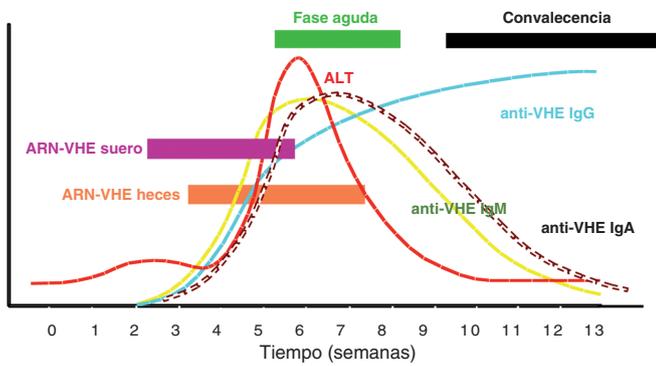


Figura 2. Evolución de la infección por el virus de la hepatitis E (VHE). ALT: alanina transaminasa; Ig: inmunoglobulina.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de laboratorio de la HE se basa principalmente en la detección de anticuerpos frente al virus (anti-IgG-VHE y anti-IgM-VHE) por métodos inmunoenzimáticos (ELISA) y la detección del ARN (ARN-VHE) mediante reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en los casos en que está indicado.

En la infección aguda, los anticuerpos anti-IgM-VHE preceden a los anti-IgG-VHE, se encuentran al inicio de la sintomatología clínica y desaparecen a los 4-5 meses⁵⁷ (fig. 2). Varios estudios confirman que los tests disponibles comercialmente tienen diferencias importantes en cuanto a sensibilidad y especificidad, lo que da lugar a resultados discordantes^{58,59}. Sin embargo, estas pruebas son lo suficientemente sensibles, entre el 90 y el 97%^{60,61}, como para utilizarlos de primera línea en el diagnóstico de infección aguda incluso en enfermos inmunodeprimidos⁶². Sin embargo, hay que recordar que en estos últimos es imprescindible realizar la detección del ARN-VHE en caso de ausencia de anticuerpos anti-IgM-VHE en sangre.

Un problema importante es la reacción cruzada con otros virus, especialmente con citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, por lo que conviene descartar infecciones agudas por estos virus⁶³.

Los anticuerpos anti-IgG-VHE aparecen después de los anti-IgM-VHE y su título aumenta hasta la fase de convalecencia, pudiendo permanecer detectables hasta 14 años⁶⁴ después de la infección. Su presencia indica infección por VHE, pero no implica que sea aguda a no ser que se evidencie una seroconversión de anti-IgG-VHE con una muestra de sangre previa.

El ARN-VHE se encuentra en sangre en todos los pacientes en las primeras 2 semanas después del inicio de los síntomas y puede permanecer detectable hasta 16 semanas⁶⁵. Aparece en heces 2 semanas antes de las manifestaciones clínicas y en sangre unos días después, pudiendo persistir hasta 4-6 semanas. La sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas disponibles, la mayoría caseras, varía mucho. En este momento no hay ninguna técnica, comercial o casera aprobada por la Food and Drug Administration⁶⁶. Por esto, la OMS ha desarrollado un estándar internacional con un valor de 250.000 UI/ml y ha elegido el G3 por ser el más extendido y el que origina las hepatitis crónicas en países desarrollados⁶⁷. En esta variabilidad en los resultados, unido a que los valores de ARN-VHE en sangre son bajos e incluso ya indetectables cuando el paciente busca atención médica, se admite que un resultado negativo no descarta la infección por VHE⁹. A pesar de esto, la RT-PCR para detectar el ARN-VHE es una técnica imprescindible para identificar una infección activa, confirmar los resultados serológicos y monitorizar el tratamiento. Además, hay que tener en cuenta que en todos los pacientes inmunodeprimidos siempre se debe realizar la detección del ARN-VHE. En unos casos confirmará el diagnóstico, en otros sirve para identificar una hepatitis aguda que se cronifica o bien para monitorizar el tratamiento, si es necesario.

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de hepatitis aguda E no ofrece problemas. En la figura 3 se propone un sencillo algoritmo diagnóstico de HE en países de baja prevalencia.

Tratamiento

En general, la HE aguda solo requiere tratamiento sintomático y hay escaso número de casos comunicados en la literatura que hayan requerido la administración de antivirales. Sin embargo, es imprescindible comenzar el tratamiento lo antes posible en el caso de hepatitis crónica. El antiviral de elección, además de disminuir la in-

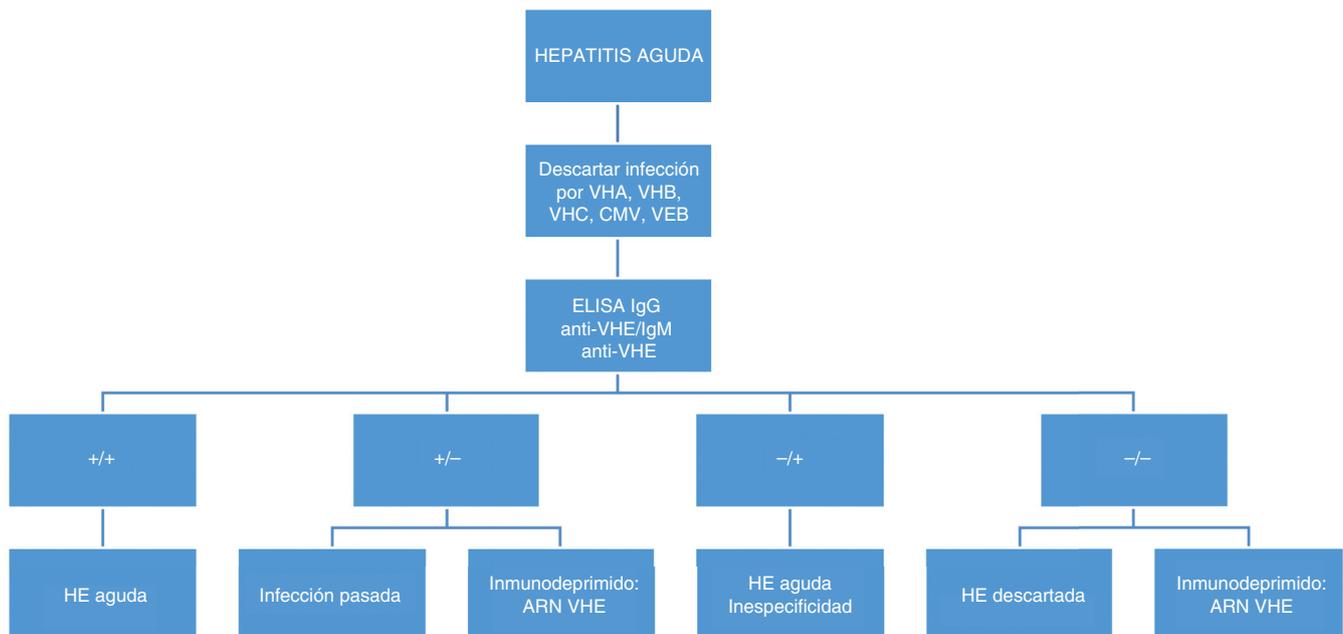


Figura 3. Algoritmo diagnóstico propuesto para hepatitis E (HE) aguda en países de baja prevalencia. CMV: citomegalovirus; IgG: inmunoglobulina G; VEB: virus de Epstein-Barr; VHA: virus de la hepatitis A; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C.

Tabla 4

Cuadros clínicos en los que se debe sospechar hepatitis E (pedir IgG anti-VHE, IgM anti-VHE y/o ARN-VHE)

Hepatitis aguda con marcadores para HA, HB y HC negativos
Hepatitis agudas con factor de riesgo (animales, comidas exóticas, viajes a zona endémica, etc.), independientemente de tener otros marcadores virales positivos
Fallo hepático o descompensación en hepatopatía crónica
Hepatitis tóxica por medicamentos o alcohol
Hepatitis autoinmune
Hepatopatía crónica en inmunodeprimidos

HA: hepatitis A; HB: hepatitis B; HC: hepatitis C; VHE: virus de la hepatitis E.

munosupresión en lo posible, es la ribavirina, alcanzándose tasas de respuesta cercanas al 85%. No hay acuerdo en cuanto a la duración del tratamiento, que puede variar entre 4 y 12 semanas, y a la dosis del antiviral a administrar^{3,68}.

Conclusiones

Está comprobado que el VHE circula en España en aguas residuales, se ha aislado de alimentos y debe tener reservorios aún desconocidos, puesto que en la mayoría de los casos autóctonos no se identifica ningún factor de riesgo. En estos últimos años se han comunicado en España un número elevado de casos autóctonos de HE agudas, crónicas en inmunodeprimidos, y algún caso aislado en inmunocompetentes, fulminantes, e incluso alguna infección extrahepática grave. La prevalencia es más baja que en otros países europeos. A pesar del número de casos comunicados, la incidencia no parece muy alta, aunque no hay cifras oficiales. La incidencia de HE crónicas en pacientes trasplantados hepáticos es también muy baja. Esto llama la atención en un país donde la cabaña porcina es muy abundante y también un consumo de carne de cerdo mayor que en otros países industrializados. Esta situación epidemiológica tan favorable en este momento en España puede no ser reflejo de la situación real debido a falta de información sobre esta enfermedad, y podría cambiar en los próximos años.

Las cepas del VHE que se han aislado en España, tanto de pacientes como de aguas residuales o de otros reservorios, pertenecen al G3 y la mayoría al subtipo 3f. Este genotipo es el que se encuentra en la cabaña porcina en nuestro país y el que ha originado todas las hepatitis crónicas y fulminantes comunicadas hasta este momento.

A pesar de haberse comunicado 1 caso de hepatitis aguda E por transfusión de hemáties, la situación epidemiológica actual y la baja incidencia de infección por VHE no justifica en este momento el cribado de esta infección en donantes de sangre en España. Los datos de viremia en donantes de sangre en otros países industrializados también lo desaconsejan. Sin embargo, es imprescindible llamar la atención sobre la existencia de casos autóctonos y de la necesidad de descartar la infección en pacientes inmunodeprimidos. La tabla 4 muestra las situaciones clínicas en las que se debe sospechar infección por VHE. Por lo tanto, los laboratorios de microbiología deben disponer de los métodos ELISA adecuados para la detección de anticuerpos frente al VHE y de la técnica RT-PCR para detección del ARN-VHE, con el fin de facilitar un diagnóstico rápido, principalmente en los casos graves y en pacientes inmunodeprimidos, para instaurar el tratamiento con ribavirina lo antes posible, antiviral que se ha mostrado eficaz en la mayoría de las ocasiones.

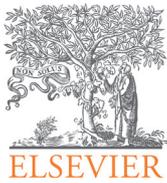
Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- World Health Organization (WHO). Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. *Wkly Epidemiol Rep.* 2015;90:185-200.
- Stevens O, Caléis KG, Poesen K, Saegeman V, Van Damme P. Diagnostic Challenges and Clinical Characteristics of Hepatitis E Virus-Associated Guillain-Barre Syndrome. *JAMA Neurol.* 2017;74:26-33.
- Pérez-Gracia MT, Suay-García B, García M, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: latest developments in knowledge. *Future Microbiol.* 2016;11:789-808.
- López-Fabal MF, Gómez-Garcés JL. Seroprevalencia del virus de la hepatitis E en pacientes con hepatitis C y/o infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev Esp Quimioter.* 2015;28:314-6.
- Lens S, Mensa L, Gambato M, Gonzalez P, Torras X, Soriano J, et al. HEV infection in two referral centres in Spain, epidemiology and clinical outcomes. *J Clin Virol.* 2015;63:76-80.
- Benito R, Bueno J, Cebollada R, Algarate S. Infecciones por virus de la hepatitis E en Zaragoza (2011-2015). *Med Clin (Barc).* 2016;146:512-4.
- Mateos Lindemann ML, Diez Aguilar M, González Galdamez A, Graus Morales J, Moreno Zamora A, Pérez Gracia MT. Hepatitis agudas, crónicas y fulminantes por virus de hepatitis E: siete años de experiencia (2004-2011). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:595-8.
- Mora Soler AM, Velasco-Guardado A, Martín Arribas MI, Acosta Materan R, Revilla Morato S, Pérez Coret D, et al. Hepatitis crónica por virus de la hepatitis E tratada con ribavirina. *Gastroenterol Hepatol.* 2016;39:597-8.
- Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol.* 1997;71:7207-13.
- Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991;185:120-31.
- Parvez MK, Al-Dosari MS. Evidence of MAPK-JNK1/2 activation by hepatitis E virus ORF3 protein in cultured hepatoma cells. *Cytotechnology.* 2015;67:545-50.
- Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005521.
- Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol.* 2001;2:282-92.
- Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol.* 2006;16:5-36.
- Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95:2223-32.
- Smith DB, Purdy MA, Simmonds P. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol.* 2013;87:4161-9.
- Guan D, Li W, Su J, Cao J. Asian musk shrew as a reservoir of rat hepatitis E virus, China. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1341-3.
- Pérez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infect Genet Evol.* 2014;22:40-59.
- Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, et al. Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology.* 2016;150:355-7.
- Jia Z, Yi Y, Liu J, Cao J, Zhang Y, Tian R, et al. Epidemiology of Hepatitis E Virus in China: Results from the Third National Viral Hepatitis Prevalence Survey. *PLoS One.* 2014;9:e110837.
- Pérez-Gracia MT, García M, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3:117-26.
- Balayan MS, Andjapardize AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in Non-A, Non-B hepatitis transmitted via faecal-oral route. *Intervirology.* 1983;20:23-31.
- Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E: the current scenario. *Int J Infect Dis.* 2013;17:228-33.
- Kmush B, Wierzbica T, Krain L, Nelson K, Labrique AB. Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin Liver Dis.* 2013;33:15-29.
- ProMED-ESP [consultado 11-2016]. Disponible en: www.promedmail.org/es
- Dawson GJ, Mushahwar IK, Chau KH, Gitnick GL. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet.* 1992;240:426-7.
- Chapman BA, Burt MJ, Wilkinson ID, Schousboe MI. Community acquired viral hepatitis in New Zealand: a case of sporadic hepatitis E virus infection. *Aust NZ J Med.* 1993;23:722-3.
- Fletcher J. A traveller returning from Nepal with hepatitis E. *Med J Aust.* 1993;159:63.
- Acharya SK, Panda SK. Hepatitis E: water, water everywhere - now a global disease. *J Hepatol.* 2011;54:9-11.
- García M, Fernández-Barredo S, Pérez-Gracia MT. Detection of hepatitis E virus (HEV) through the different stages of pig manure composting plants. *Microb Biotechnol.* 2013;7:26-31.
- Psychogiou M, Tzala E, Boletis J, Zakopoulou N, Loutradi A, Maliori M, et al. Hepatitis E virus infection in individuals at high risk of transmission of non-A, non-B hepatitis and sexually transmitted diseases. *Scand J Infect Dis.* 1996;28:443-5.
- Khuroo MS, Kamili S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat.* 2009;16:519-23.
- Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet.* 1995;345:1025-6.

34. Galiana C, Fernández-Barredo S, Pérez-Gracia MT. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) and risk factors in pig workers and blood donors. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:602-7.
35. Pérez-Gracia MT, Mateos ML, Galiana C, Fernández-Barredo S, García A, Gómez MT, et al. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:893-96.
36. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:2309-23.
37. Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A, et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis.* 2008;198:1732-41.
38. Mesquita JR, Oliveira D, Rivadulla E, Abreu-Silva J, Varela MF, Romalde JL, et al. Hepatitis E virus genotype 3 in mussels (*Mytilus galloprovincialis*), Spain. *Food Microbiol.* 2016;58:13-5.
39. Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1738-44.
40. Riveiro-Barciela M, Mínguez B, Gironés R, Rodríguez-Frías F, Quer J, Buti M. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J Clin Gastroenterol.* 2015;49:165-8.
41. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion.* 2004;44:934-40.
42. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med.* 2006;16:79-83.
43. Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:648-9.
44. Riveiro-Barciela M, Sauleda S, Quer J, Salvador F, Gregori J, Pirón M, et al. Red blood cell transfusion-transmitted acute hepatitis E in an immunocompetent subject in Europe: a case report. *Transfusion.* 2017;57:244-7.
45. Sauleda S, Ong E, Bes M, Janssen A, Cory R, Babizki M, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion.* 2015;55:972-9.
46. Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Geron S, Arbiza J. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med.* 2014;4:45-9.
47. Dalton HR, Seghatchian J. Hepatitis E virus: Emerging from the shadows in developed countries. *Transfus Apher Sci.* 2016;55:271-4.
48. Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, Hayashi PH, Protiva P, Kleiner DE, et al. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology.* 2011;41:1665-72.
49. Kamar N, Rostainf L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant.* 2013;13:1935-6.
50. Kamar N, Rostainf L, Izopet J. Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: natural history and therapy. *Semin Liver Dis.* 2013;33:62-70.
51. Geng Y, Zhang H, Huang W, Geng K, Li Z. Persistent hepatitis E virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukaemia. *Hepat Mon.* 2014;14:e15618.
52. Behrebdt P, Luth S, Dammermann W, Drave W, Brown RJ, Todt RJ, et al. Exacerbation of hepatitis E virus infection during anti-TNF alfa treatment. *Joint Bone Spine.* 2017;84:217-9.
53. González-Tallón AI, Moreira Vicente V, Mateos Lindemann ML. Chronic hepatitis E in an immunocompetent patient. *Gastroenterol Hepatol.* 2011;34:398-400.
54. Grewal P, Kamili S, Moramed D. Chronic hepatitis E in an immunocompetent patient: a case report. *Hepatology.* 2008;17:343-7.
55. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Quezzani L, Peron JM, Guitard J. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N England J Med.* 2008;358:811-7.
56. Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard HJ, et al. Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation. *Gut.* 2012;61:597-603.
57. Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011;161:84-92.
58. Hyams C, Mabayoje DA, Copping R. Serological cross-reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol.* 2014;86:478-83.
59. Wu WC, Su CW, Yang JY, Lin SF, Chen JY, Wu JC. Application of serologic assays for diagnosis acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *J Med Virol.* 2014;86:720-8.
60. Legrand-Abravanel F, Thevenet I, Mansuy JM, Saune K, Visch F, Peron JM, et al. Good performance of immunoglobulin M assays in diagnosing genotype 3 hepatitis E virus infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:772-4.
61. Drobeniuc J, Meng K, Reuter G, Green-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z, et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation or performances. *Clin Infect Dis.* 2010;51:24-7.
62. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Miedouge M, Peron JM, Alric L, et al. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol.* 2013;58:624-8.
63. Hyams C, Mabayoje DA, Copping R. Serological cross-reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol.* 2014;86:478-83.
64. Dawson GJ, Mushahwar IK, Chau KH, Gnitnick GL. Detection of long-lasting antibody to hepatitis E virus in a US traveller to Pakistan. *Lancet.* 1992;340:426-7.
65. Nanda SK, Ansari IH, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology.* 1995;108:225-30.
66. Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM; HEV Collaborative Study Group. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1234-9.
67. Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Sakata H, Okad Y, Nublinger M, et al; HEV Collaborative Study Group. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:729-35.
68. Dalton HR, Kamar N. Treatment of hepatitis E virus. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:639-44.
69. Mateos Lindemann ML, Diez-Aguilar, González Galdamez AL, Galán JC, Moreno A, Pérez Gracia MT. Patients infected with HIV are at high-risk for hepatitis E virus infection in Spain. *J Med Virol.* 2014;86:71-4.
70. Mateos-Lindemann ML, González-Galdámez A, Bordallo-Cardona M, Pérez-Gracia MT. Are HIV-infected patients a high-risk population for hepatitis E virus infection in Spain? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:582-3.
71. Pérez-Gracia MT, García-Valdivia MS, Galán F, Rodríguez-Iglesias MA. Detection of hepatitis E virus in patients sera in southern Spain. *Acta Virol.* 2004;48:197-200.
72. Rivero-Juárez A, Martínez-Dueñas L, Martínez-Peinado A, Camacho A, Cifuentes C, Gordon A, et al. High hepatitis E virus seroprevalence with absence of chronic infection in HIV-infected patients. *J Infect.* 2015;70:624-30.
73. Jardí R, Crespo M, Homs M, Van den Eynde E, Gironés R, Rodríguez-Manzano J, et al. HIV, HEV and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV Med.* 2012;13:379-83.
74. Buti M, Domínguez A, Plans P, Jardí R, Schaper M, Espuñes J, et al. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:1328-32.
75. Lindemann ML, Gabilondo G, Romero B, De la Maza OM, Pérez-Gracia MT. Low prevalence of hepatitis E infection among pregnant women in Madrid, Spain. *J Med Virol.* 2010;82:1666-8.
76. Mateos ML, Camarero C, Lasa E, Teruel JL, Mir N, Baquero F. Hepatitis E virus: relevance in blood donors and risk groups. *Vox Sang.* 1999;76:78-80.
77. Tarragó D, López-Vélez R, Turrientes C, Baquero F, Mateos ML. Prevalence of hepatitis E antibodies in immigrants from developing countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:309-11.
78. Arankalle VA, Chobe LP. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for post-transfusion hepatitis E. *Vox Sang.* 2000;79:72-4.
79. Khuroo MS, Kamili S, Yattoo GN. Hepatitis E virus infection may be transmitted through blood transfusions in an endemic area. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:778-84.
80. Zaaier HL. No artifact, hepatitis E is emerging. *Hepatology.* 2015;62:654.
81. Hogema BM, Molier M, Sjerps M, De Waal M, Van Swieten P, Van de Laar T, et al. Incidence and duration of hepatitis E virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion.* 2016;56:722-8.
82. Hogema BM, Molier M, Slot E, Zaaier HL. Past and present of hepatitis E in the Netherlands. *Transfusion.* 2014;54:3092-6.
83. Slot E, Hogema BM, Riezebos-Brilman A, Kok TM, Molier M, Zaaier HL. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro Surveill.* 2013;18:20550.
84. Juhl D, Baylis SA, Blümel J, Görg S, Hennig H. Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus infection in German blood donors. *Transfusion.* 2014;54:49-56.
85. Vollmer T, Diekmann J, Johne R, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2708-13.
86. Baylis SA, Gartner T, Nick S, Oveymyr J, Blümel J. Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States. *Vox Sang.* 2012;103:89-90.
87. Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, Yoshikawa A, Mizoguchi H, Endo K, et al. Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol.* 2007;79:734-42.
88. Fukuda S, Sunaga J, Saito N, Fujimura K, Itoh Y, Sasaki M, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among Japanese blood donors: identification of three blood donors infected with a genotype 3 hepatitis E virus. *J Med Virol.* 2004;73:554-61.
89. Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, et al. Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan. *Vox Sang.* 2016;111:242-6.
90. Ren F, Zhao C, Wang L, Wang Z, Gong X, Song M, et al. Hepatitis E virus seroprevalence and molecular study among blood donors in China. *Transfusion.* 2014;54:910-7.
91. Gallian P, Lhomme S, Piquet Y, Sauné K, Abravanel F, Assal A, et al. Hepatitis E virus infections in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1914-7.
92. Harrishoj LH, Holm DK, Saekmose SG, Jensen BA, Hogema BM, Fischer TK, et al. Low transfusion transmission of hepatitis E among 25,637 single-donation, nucleic acid-tested blood donors. *Transfusion.* 2016;56:2225-32.
93. Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, et al. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *Lancet.* 2014;384:1766-73.
94. O'Riordan J, Boland F, Williams P, Donnellan J, Hogema BM, Ijaz S, et al. Hepatitis E virus infection in the Irish blood donor population. *Transfusion.* 2016;56:2868-76.
95. Fischer C, Hofmann M, Danzer M, Hofer K, Kaar J, Gabriel C. Seroprevalence and incidence of hepatitis E in blood donors in Upper Austria. *PLoS One.* 2015;10:e0119576.
96. Stramer SL, Moritz ED, Foster GA, Ong E, Linnen JM, Hogema BM, et al. Hepatitis E virus: seroprevalence and frequency of viral RNA detection among US blood donors. *Transfusion.* 2016;56:481-8.
97. Cleland A, Smith L, Crossan C, Blanchard O, Dalton HR, Scobie L, et al. HEV seroprevalence and HEV RNA presence in plasma minipools of Scottish blood donors. *Vox Sang.* 2013;105:283-9.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Parásitos e inmigración: ¿cuál es la mejor actitud?

Sara Hernández-Egido^a, María Siller-Ruiz^a, Moncef Belhassen-García^{a,b,c,d} y Juan Luis Muñoz-Bellido^{a,c,d,e,*}

^aInstituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, España

^bConsulta de Enfermedades Tropicales, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España

^cUnidad de Investigación Consolidada de Castilla y León UIC-079 sobre Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Salamanca, España

^dCentro de Investigación de Enfermedades Tropicales, Universidad de Salamanca (CIETUS), Salamanca, España

^eServicio de Microbiología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España

RESUMEN

Palabras clave:
Parasitosis
Inmigración
Enfermedades tropicales

El aumento de la población inmigrante en Europa (en España se considera que supone, en este momento, el 10% de la población total) conlleva un incremento en la prevalencia de determinadas enfermedades, en especial enfermedades infecciosas, y obliga a enfocar el estudio de los pacientes teniendo muy en cuenta las enfermedades prevalentes en su zona de origen. Diferentes organismos defienden el cribado sistemático, o el tratamiento empírico indiscriminado. El cribado debe incluir, al menos, un estudio coproparasitológico, de hemoparásitos y de parásitos urinarios. El estudio coproparasitológico es esencial, dada la alta prevalencia de parásitos intestinales en población procedente de áreas tropicales y subtropicales. La búsqueda de hemoparásitos es fundamental para la detección de *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma* y también de algunas filarias. En individuos asintomáticos procedentes de zonas endémicas para *Plasmodium* es primordial la introducción de técnicas moleculares, dada la baja sensibilidad del resto. Todo individuo procedente de áreas endémicas para filariasis o enfermedad de Chagas debe ser sometido al cribado de estas. El cribado de *Trypanosoma cruzi* es de especial relevancia en embarazadas y donantes de sangre y de órganos. Se revisan los agentes etiológicos a tener en cuenta en población inmigrante ante un síndrome febril, cardiovascular, respiratorio, digestivo, hepatoesplenomegalia, síndromes nefrourológicos, neurológicos, reumatológicos, oftalmológicos, otorrinolaringológicos y cutáneos.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Parasites and immigration: what is the best approach?

ABSTRACT

Keywords:
Parasitosis
Immigration
Tropical diseases

The increasing immigrant population in Europe (in Spain it is assumed to account for 10% of the total population) is leading to a higher prevalence of some diseases, especially infectious diseases. When studying these patients, the most prevalent diseases in their area of origin must be taken into account. Different agencies advocate systematic screening, or indiscriminate empirical treatment. Screening should include a search for parasites in stool, blood and urine samples. Stool parasitological studies are fundamental, given the high prevalence of intestinal parasites in populations from tropical and subtropical areas. The search for blood parasites is essential for the detection of *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma* and also some filaria. In asymptomatic individuals coming from areas endemic for *Plasmodium*, the use of molecular techniques is necessary, given the low sensitivity of conventional methods. All individuals from areas endemic for filariasis or Chagas disease should be screened. Screening for *Trypanosoma cruzi* is particularly important in pregnant women and blood and organ donors. We review the main agents to be considered in immigrant patients showing febrile, cardiovascular, respiratory or gastrointestinal syndromes, hepatoesplenomegaly, and nephro-urological, neurological, rheumatologic, ophthalmological, ear, nose and throat (ENT) and cutaneous syndromes.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.
Correo electrónico: jlmubel@usal.es. (J.L. Muñoz Bellido).

Introducción

La distribución geográfica de las enfermedades transmisibles se ve influenciada de manera decisiva por factores económicos, sociales, culturales, climatológicos, etc. Modificaciones de estos factores son capaces de determinar cambios drásticos en la prevalencia y distribución de estas enfermedades. En las últimas décadas asistimos a un aumento de la importancia, en los países occidentales, de enfermedades propias de áreas geográficas distantes, sobre todo tropicales, y de enfermedades que se consideraban casi desaparecidas, o al menos muy controladas en estos países. Aunque el origen de esta circunstancia es multifactorial (cambios en la climatología, intensificación de los intercambios comerciales, etc.), los movimientos de población, incluyendo los movimientos migratorios, tienen una influencia decisiva.

La población extranjera censada en España, en el año 2000, suponía apenas un 2,3% de la población del país. Diez años después, el número de extranjeros censados se había multiplicado por 6, llegando a las 5.750.000 personas y suponiendo más del 12% de la población. Tras una retracción asociada a la crisis económica, en este momento hay censados en España en torno a 4.400.000 extranjeros, que suponen cerca del 10% de la población¹. Las áreas de origen predominantes son Iberoamérica (en torno al 36%), Europa occidental (21%), Europa oriental (18%) y África del norte (15%). África subsahariana supone el 4%, Extremo Oriente el 3% y el subcontinente indio en torno al 1,5%. Hay que tener en cuenta además que el colectivo de inmigrantes ilegales, mucho más difícil de controlar y evaluar, y procedente en su mayoría de áreas con alta prevalencia de parasitosis, se estima en torno al 15% del total.

El enfoque sanitario de esta población debe tener características específicas, ya que procede de zonas en que la prevalencia de algunas enfermedades, en especial infecciosas, es muy distinta a la local. Ello afecta tanto al inmigrante enfermo como al asintomático. Uno de los grupos de enfermedades transmisibles en los que estas diferencias son más marcadas son las parasitosis. Durante años, las parasitosis han sido un grupo de enfermedades en franca regresión en los países desarrollados, al menos entre la población autóctona. Un estudio reciente² muestra que el parásito digestivo más frecuente en nuestro medio es *Blastocystis hominis* (7%), seguido de *Giardia duodenalis* (3,9%) y *Dientamoeba fragilis* (1,6%). *Entamoeba coli* y *Cryptosporidium* spp. se detectan en el 0,7% de los pacientes con clínica compatible con parasitosis intestinal, y otros protozoos (*Iodamoeba*, *Endolimax*, etc.) se detectan en menos del 0,1%. El helminto detectado con mayor frecuencia es *Enterobius vermicularis* (0,6%), mientras que el resto (*Taenia*, *Trichuris*, *Ascaris*, *Fasciola*, etc.) supone menos del 0,1%. Sin embargo, otro estudio³ muestra cómo el 47,1% de los niños inmigrantes, sintomáticos o no, presentaban algún tipo de parasitación, con una alta prevalencia de organismos excepcionales en población autóctona, como *Filaria*, *Schistosoma* y *Strongyloides*. Datos como estos obligan a abordar las parasitosis en población inmigrante con un enfoque distinto al de la población autóctona, dada su frecuencia y su potencial gravedad, planteándose la pertinencia de realizar cribados sistemáticos en la población inmigrante^{4,5}.

Claves en el diagnóstico de parasitosis importadas

La historia epidemiológica juega un papel prioritario. Debe recoger: tipo de paciente (inmigrante, expatriado, viajero, etc.); edad; nacionalidad, país y zona de procedencia inmediata, dada la diversidad climática de algunos países, y ruta de llegada; ambiente rural o urbano; exposiciones en el país de origen (tabla 1); fecha del último viaje, y tiempo de estancia en España y en la zona endémica. Estos últimos datos son clave, ya que permiten excluir algunas parasitosis en función del período de incubación. Otras protozoosis (absceso amebiano, enfermedad de Chagas) y helmintiasis pueden manifestarse pasados meses o años de la infección, tiempo después de que el

paciente haya abandonado el área endémica. Así, *Strongyloides stercoralis* puede sobrevivir hasta 70 años y originar síntomas años después de la infección, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos⁶.

Cribado en el paciente asintomático

Existen 2 posturas respecto a la actitud a tomar: el cribado sistemático, dirigido sobre todo a parasitosis que pueden permanecer latentes durante largos períodos, y el tratamiento empírico indiscriminado. Los CDC⁷ recomiendan el tratamiento indiscriminado con albendazol e ivermectina, en el país de origen, a todos los refugiados procedentes de Oriente Medio, Asia, África del norte, Latinoamérica y Caribe, y con albendazol, ivermectina y praziquantel a todos los procedentes de África subsahariana, excepto los relacionados con áreas endémicas para *Loa loa*. En este caso, se debe evitar el uso de ivermectina hasta que la loasis se haya descartado, aunque ello implique tener que manejar una posible strongiloidosis en el país receptor. Existen estudios de coste-beneficio que avalan este abordaje⁸. Esta estrategia tiene el problema de no poder implementarse de manera sistemática en niños y gestantes, en lactancia materna y, obviamente, en inmigrantes irregulares. A ello hay que añadir el riesgo de efectos adversos y complicaciones, como ocurre en el caso de neurocisticercosis, y la presión ecológica que puede redundar en el desarrollo de resistencias. Por ello consideramos que, mientras no existan estudios más amplios y exhaustivos, el cribado parasitológico en inmigrantes asintomáticos se debe mantener. Este cribado debe cumplir una serie de criterios. La enfermedad debe suponer un problema de salud pública por su gravedad, por su prevalencia o por su repercusión en la población⁹, y solo se deben incluir patologías cuyo diagnóstico vaya a suponer una intervención que mejore la salud del inmigrante. El cribado debe incluir al menos un estudio coproparasitológico, de hemoparásitos y de parásitos urinarios, en función de los factores de riesgo (sobre todo, el área geográfica de procedencia) del paciente. Desafortunadamente, en España, a pesar de ser un país receptor, no existen protocolos de cribado ni normativas homogéneas a nivel nacional para este grupo poblacional, ni siquiera en relación con situaciones específicas como hemodonaciones y donaciones de órganos.

Estudio parasitológico

Durante años, el diagnóstico parasitológico se basó en técnicas manuales, laboriosas y cuya rentabilidad diagnóstica dependía de la experiencia del profesional que las realiza. Con posterioridad se han descrito métodos moleculares más sensibles y rápidos, pero con frecuencia se han comercializado para las enfermedades más frecuentes en nuestro medio (*Trichomonas*, *Giardia*, *Cryptosporidium*), y solo para algunas importadas.

Estudio coproparasitológico

Es esencial para el cribado de parasitosis en este grupo de pacientes, ya que las parasitosis intestinales afectan al 14-64% de la población procedente de zonas tropicales o subtropicales¹⁰. La microscopía óptica ha sido durante décadas el método de referencia para estos estudios. Es una técnica específica, pero relativamente poco sensible y, con algunas excepciones como la strongiloidosis, su rendimiento es menor cuanto más tiempo pasa desde la llegada del inmigrante, hasta el punto de que algunos autores defienden que, en ausencia de datos clínicos o analíticos (eosinofilia), no es rentable realizarla a partir de los 12 meses de permanencia del paciente en nuestra área¹¹. Aunque algunos autores defienden el estudio de una sola muestra¹², como regla general consideramos útil el procedimiento tradicional de 3 muestras, recogidas en días alternos, para aumentar la sensibilidad del método.

El método más utilizado para el estudio coprológico es la concentración con formol-éter y centrifugación, o test de Ritchie, y la tinción

Tabla 1
Relación entre diferentes parasitosis y exposiciones específicas

	Exposiciones	Infecciones
Alimentos	Agua no tratada	Giardiasis, amebiasis, ciclosporiasis
	Carne poco o mal cocinada	Triquinosis, toxoplasmosis, cisticercosis, cestodosis
	Verduras o frutas poco lavadas o cocinadas	Fasciolosis, amebiasis
	Pescado no cocinado	Gnatostomosis, anisakidosis, clonorchiasis
	Caracoles de tierra	Angiostrongiloidosis
Contacto	Agua dulce (fangos y/o lodos)	Amebas de vida libre, esquistosomosis, estrombiloidosis, uncinariasis
	Tierra (caminar descalzo)	Estrongiloidosis, larva <i>migrans</i> cutánea, tungiasis, anquilostomosis, miasis
Picaduras	Mosquitos	Malaria, filariasis
	Moscas	Tripanosomiasis africana, oncocercosis, leishmaniasis
	Triatómidos	Tripanosomiasis americana
Vivienda	Ausencia de fosa séptica	Parasitosis intestinales
	Adobe (Latinoamérica)	Tripanosomiasis americana

con lugol. La sensibilidad es relativamente baja, por lo que existen técnicas de concentración alternativas para parasitosis concretas, como los métodos de concentración (Baerman, Harada-Mori) o cultivo en agar o carbón para *Strongyloides* spp.¹³, o la técnica de sedimentación de Kato-Katz para *Schistosoma* y *Fasciola*¹⁴. Numerosos laboratorios han sustituido la técnica de Ritchie por métodos comerciales de concentración por centrifugación-filtración que facilitan el trabajo técnico. Se debe incorporar además una tinción ácido-alcohol resistente para el diagnóstico de coccidios, en especial en inmunodeprimidos y en población pediátrica.

Existen disponibles también técnicas serológicas para *Strongyloides*, con buenos resultados de sensibilidad, superiores a los métodos de concentración, sobre todo en portadores crónicos asintomáticos, por lo que algunos autores recomiendan su uso sistemático en inmigrantes procedentes de áreas endémicas¹⁵.

Las técnicas de detección de antígenos parasitarios basadas en enzimoanálisis y en inmunocromatografía son rápidas, sencillas y específicas, aunque la sensibilidad no siempre es óptima. De cara al cribado tienen el inconveniente de que solo están disponibles para algunos microorganismos, de modo que no evitan la realización de las técnicas microscópicas clásicas.

Los métodos moleculares aportan rapidez y especificidad, con sensibilidades al menos similares al resto de técnicas. Tienen especial interés las que permiten la detección rápida y simultánea de múltiples patógenos, como PCR *multiplex* o técnicas basadas en *microarrays*, ya que permiten la detección simultánea de varios parásitos¹⁶. Sin embargo, este tipo de técnicas no están exentas de inconvenientes, como el elevado coste y la necesidad de personal más especializado. Se han desarrollado variantes como la LAMP, que mediante amplificación isotérmica obtienen sensibilidades y especificidades altas. Cumple la mayoría de los requisitos de cualquier técnica de campo, como la simplificación de la preparación de muestras, estabilidad de los reactivos, mínimos requerimientos de infraestructura y facilidad de utilización por el usuario final¹⁷, lo que facilita su implantación en áreas con bajos recursos sanitarios¹⁸.

Búsqueda de parásitos en sangre

La sangre es la muestra de elección para la detección e identificación de *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma* y también de algunos nematodos, como es el caso de algunas filarias. Se ha publicado una

prevalencia alta de malaria asintomática o subclínica¹⁹, sobre todo en pacientes procedentes de África subsahariana. Por ello, los CDC recomiendan el cribado de paludismo en población inmigrante de riesgo, como embarazadas y niños²⁰. En individuos asintomáticos procedentes de zonas endémicas, la parasitemia suele ser baja, por lo que el método más indicado son las técnicas moleculares. La más utilizada en nuestro medio es la PCR a tiempo real. Tiene buena sensibilidad, permite identificar especies, detectar infecciones mixtas y cuantificar. De no estar disponibles este tipo de técnicas, se realizaría estudio microscópico de gota gruesa. La técnica rápida de detección de antígeno de *Plasmodium* no estaría indicada en estos casos, por su baja sensibilidad.

El examen microscópico de la sangre se realiza mediante extensión en gota gruesa o extensión fina (frotis) seguidas de tinción de Giemsa. La gota gruesa tiene como principal ventaja su mayor sensibilidad. Sin embargo, requiere una mayor experiencia del microscopista, ya que la lisis eritrocitaria puede distorsionar la morfología de los parásitos y dificultar su identificación. El frotis permite la identificación de especie, pero es menos sensible que la gota gruesa y no se debe utilizar como único método para el cribado de *Plasmodium*²¹. La determinación del grado de parasitemia, importante en el paludismo, es factible con ambos tipos de tinción.

Todo individuo procedente de zona endémica debe ser sometido a cribado para filariasis. Debe realizarse siempre una técnica de concentración mediante lisis-centrifugación, como el test de Knott, o de filtrado para mejorar la sensibilidad. Ha de tenerse en cuenta la periodicidad de la presencia de microfilarias en sangre. Para *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*, la toma debe ser nocturna, mientras que para *L. loa* debe ser diurna. Ante la duda, se debe extraer sangre en ambos períodos. *Mansonella* spp. no tiene periodicidad. En caso de filariasis cutánea (*Onchocerca volvulus* y *Mansonella streptocerca*) se realiza la técnica de biopsia exangüe cutánea (pellizco cutáneo), poco sensible pero muy específica²².

La enfermedad de Chagas se considera la enfermedad emergente más importante en nuestro país, principalmente por el aumento de inmigrantes procedentes de zonas endémicas²³. Su alta prevalencia aconseja su cribado en todos los inmigrantes procedentes de las zonas endémicas de Latinoamérica. Este cribado es de especial importancia en gestantes y donantes de sangre y órganos. De hecho, su control en hemodonaciones es preceptivo desde 2005 para donantes procedentes de áreas de riesgo. La mayoría de los pacientes con en-

fermedad de Chagas llegan a nuestro país en fase crónica y asintomática, pero su diagnóstico y tratamiento son obligados para evitar el desarrollo de cardiopatía y enfermedad digestiva. El diagnóstico en esta fase se basa en pruebas serológicas, ya que la parasitemia es frecuentemente indetectable. La Organización Mundial de la Salud recomienda el uso simultáneo de 2 técnicas serológicas basadas en principios diferentes, dada la frecuencia de reacciones cruzadas con *Leishmania* spp.

En el caso de algunos parásitos puede ser necesario usar otro tipo de muestras. Para *Schistosoma haematobium*, el estudio debe realizarse en orina. Al igual que en muestras fecales, se pueden realizar técnicas de concentración mediante centrifugación o filtración¹⁴.

Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos mediante pruebas serológicas suele tener alta sensibilidad pero una especificidad moderada, por la frecuencia de reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otros parásitos, como ocurre en el caso de los helmintos²⁴. La serología permite detectar infección aguda por la presencia de títulos altos de IgM o por seroconversión de los títulos de IgG. Una limitación añadida es la frecuente dificultad para diferenciar entre parasitación actual y pasada, ya que los títulos de anticuerpos pueden mantenerse altos durante meses e incluso años²⁵. Se tiende a utilizar cada vez más técnicas de enzimoimmunoanálisis y quimioluminiscencia. Otras técnicas, como la inmunofluorescencia indirecta, tienen el problema adicional

de tratarse de técnicas más laboriosas y más sujetas a variabilidad en función del observador.

Estudio del paciente sintomático

Como norma general, en población inmigrante se deben considerar en primer lugar los mismos procesos que afectan a la población autóctona. Es importante valorar la historia epidemiológica del paciente.

Las manifestaciones clínicas en inmigrantes y viajeros de larga estancia suelen ser similares. Estos pacientes presentarán habitualmente la enfermedad en fases más avanzadas y, a lo largo de años de exposición, pueden desarrollar una respuesta inmune adaptativa modificada a algunas parasitosis, circunstancias que no se dan en el viajero de corta estancia. Los principales síndromes comunes y sus etiologías parasitarias se muestran en la tabla 2.

Síndrome febril

Un síndrome febril importado puede responder tanto a una enfermedad grave como a una infección trivial y autolimitada (20%). En el síndrome febril del viajero o inmigrante habrá que descartar obligatoriamente y de forma precoz la presencia de malaria²⁶ (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae* si procede de África subsahariana, y *Plasmodium vivax* si procede de Asia o América Latina), siendo excepcionales la primoinfección por *Trypanosoma*

Tabla 2
Principales manifestaciones sindrómicas y agentes parasitarios implicados

Sistemas afectados	Principales datos clinicoanalíticos	Principales parásitos implicados
Síndrome febril	Asociado a otras manifestaciones como exantema, artritis o hepatoesplenomegalia	Síndrome de Katayama (<i>Schistosoma</i> spp.), síndrome de Loeffler (uncinaria, <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i>), eosinofilia pulmonar tropical (<i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Brugia</i> spp.), <i>Fasciola hepatica</i> , <i>Opistorchis</i> spp., <i>Clonorchis</i> spp.
Afectación renourológica	Hematuria, dolor pélvico, cáncer vesical, proteinuria	<i>Schistosoma haematobium</i> , malaria, leishmaniasis
Afectación del sistema nervioso	Alteraciones del ritmo vigilia sueño, cambios en la personalidad, nivel de conciencia, <i>delirium</i> , convulsiones, déficit neurológico, meningitis eosinofílica, afectación del sistema nervioso periférico	Malaria, tripanosomiasis africana, neurocisticercosis (<i>Taenia solium</i>), <i>Angiostrongylus cantonensis</i> , <i>Gnathostoma</i> spp., <i>Paragonimus</i> spp., <i>Schistosoma</i> spp., <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Toxocara</i> spp.
Afectación pulmonar	Tos, disnea, hemoptisis, síndrome de distrés respiratorio, infiltrados migratorios	Malaria, síndrome de Loeffler (uncinaria, <i>S. stercoralis</i> , <i>A. lumbricoides</i>), síndrome de Katayama (<i>Schistosoma</i> spp.), eosinofilia pulmonar tropical (<i>W. bancrofti</i> , <i>Brugia</i> spp.), <i>Paragonimus</i> spp., <i>Echinococcus</i> spp., <i>Toxocara</i> spp.
Afectación osteomuscular	Miopatías, artritis	<i>Trichinella</i> spp., <i>A. lumbricoides</i> , filarias
Afectación ORL	Tos, hemoptisis, disnea	Singamosis, Halzoun, <i>Dicrocoelium dendriticum</i> , <i>Linguatula serrata</i>
Afectación ocular	Conjuntivitis, queratitis, afectación corneal, retinitis, uveítis, ceguera	<i>Dirofilaria</i> spp., <i>Mansonella</i> spp., <i>Trichinella</i> spp., <i>Gnathostoma</i> spp., <i>A. lumbricoides</i> , <i>W. bancrofti</i> , <i>Echinococcus</i> spp., <i>Schistosoma</i> spp., miasis, <i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Tripanosoma</i> spp., <i>Ancylostoma</i> spp., <i>Oncocerca</i> spp., <i>Entamoeba histolytica</i> , leishmaniasis
Afectación gastrointestinal	Diarrea, hemorragia gastrointestinal, megacolon, megaesófago, obstrucción, hepatoesplenomegalia, abscesos, masas	Malaria, leishmaniasis, esquistosomiasis, <i>Opistorchis viverrini</i> , uncinarias, <i>A. lumbricoides</i> , <i>S. stercoralis</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Taenia saginata</i> , <i>T. solium</i> , <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Schistosoma japonicum</i> , <i>Anisakis simplex</i> , <i>Toxocara</i> spp., <i>Paragonimus</i> spp., <i>Angiostrongylus</i> spp., <i>Gnathostoma</i> spp.
Afectación cutánea	Petequias, equimosis, urticaria, pápulas eritematosas pruriginosas, lesiones serpiginosas migratorias, nódulos subcutáneos, atrofia cutánea, depigmentación, oncodermatitis liquenificada, oncodermatitis papular, linfangitis aguda, angioedema migratorio, granulomas, masas subcutáneas migratorias	Malaria, tripanosomiasis africana, <i>Onchocerca volvulus</i> , <i>Loa loa</i> , <i>Gnathostoma spinigerum</i> , larva currens (<i>S. stercoralis</i>), neurocisticercosis (<i>T. solium</i>), larva cutánea <i>migrans</i> , cercariosis cutánea (<i>Schistosoma</i> spp.), <i>W. bancrofti</i> , <i>Brugia</i> spp., <i>Trihinella spiralis</i> , <i>Opistorchis</i> spp., <i>Clonorchis</i> spp., <i>Paragonimus</i> spp.
Linfoadenopatía	Localizadas, generalizadas	Tripanosomiasis, filariasis, toxoplasmosis, histoplasmosis, leishmaniasis

ORL: otorrinolaringológica.

cruzi (Latinoamérica), la esquistosomosis (África subsahariana) y la infección por *Leishmania* spp.

Síndrome cardiovascular

Aunque las causas más frecuentes de insuficiencia cardíaca en estos países son la valvulopatía reumática, la miocardiopatía hipertensiva, la miocardiopatía dilatada y la pericarditis tuberculosa, pueden darse cardiopatías secundarias a parasitosis. En España, por la importancia del colectivo latinoamericano, la enfermedad de Chagas es, con mucha diferencia, la causa parasitaria más frecuente de cardiopatía. Otros cuadros de cardiopatía menos frecuentes son el *cor pulmonale* secundario a esquistosomosis crónica en pacientes subsaharianos²⁷, y la *fibrosis endomiocárdica* en inmigrantes procedentes de áreas de Malasia, África central y occidental y Brasil. La patogenia se debería a infecciones parasitarias mantenidas, especialmente filariosis u otras helmintosis. Suele diagnosticarse en personas jóvenes con signos de insuficiencia cardíaca derecha. El control de la eosinofilia en fases tempranas es obligado, mediante tratamiento etiológico y el uso eventual de esteroides.

Síndrome respiratorio

Las causas más frecuentes son virales y bacterianas, y se deberá excluir siempre a la tuberculosis, independientemente de las manifestaciones clínicas o radiológicas. El primer paso es evaluar la radiografía de tórax y la presencia o ausencia de eosinofilia. La presencia de eosinofilia sugiere una helmintosis, excepto en la hiperinfestación por *Strongyloides* spp., o en la hidatidosis con quiste intacto. La presencia de infiltrados bilaterales sugiere una eosinofilia pulmonar tropical, la asociación de hipertensión pulmonar con patrón miliar una esquistosomosis crónica, y la afectación pleural predominante una paragonimosis. En ausencia de eosinofilia, la neumonía bilateral con afectación sistémica en un paciente que ha recibido corticoides o infectado por HTLV-I (virus linfotrópico de células T humanas-I) sugiere como primera posibilidad una hiperinfestación por *Strongyloides* spp. Un nódulo o una masa pulmonar aislada hará sospechar una hidatidosis o difilariosis²⁸. Algunas parasitosis infrecuentes en nuestro medio, como la paragonimosis, pueden presentar un patrón seudotuberculoso.

Síndrome digestivo

En la fase crónica, la enfermedad de Chagas puede lesionar cualquier parte del tubo digestivo. Las localizaciones más afectadas son el esófago y el colon, siendo características las manifestaciones esofágicas tipo disfagia. En caso de hemorragia digestiva se debe descartar la infección por *Strongyloides* spp. Un gran número de geohelminthos y algunos protozoos producen dispepsia. En inmigrantes procedentes de zonas tropicales o subtropicales que presenten un cuadro de *malabsorción intestinal*, se deben descartar esprúe tropical y giardiasis. Los helmintos, y en especial *Ascaris lumbricoides*²⁹, son frecuentes como causa de cuadros obstructivos. Otras posibilidades son los amebomas, los seudotumores producidos en respuesta a la infección por esquistosomas, y la estenosis y los vólvulos del colon relacionados con la enfermedad de Chagas. Las causas irritativas más comunes son la rotura del quiste o del absceso hepático, del bazo y las apendicitis relacionadas con afectación parasitaria (*Ascaris* spp., *Schistosoma* spp., *Entamoeba histolytica*, *Echinococcus granulosus*). Una masa en fosa ilíaca derecha en el inmigrante debería hacer pensar en una infección por *Angiostrongylus costarricensis* (en personas de Centro y Sudamérica) y en amebomas.

Hepatoesplenomegalia

Se debe considerar como *lesiones hepáticas focales* a lesiones únicas, como el absceso amebiano y la hidatidosis. La obstrucción de la

vía biliar extrahepática sugiere una infección por trematodos, geohelminthos o un colangiocarcinoma en pacientes con parasitosis crónica de la vía biliar. La esquistosomosis hepatoesplénica se debe incluir en el diagnóstico de la *hepatoesplenomegalia difusa con datos de hipertensión portal*. Si no existen datos de hipertensión portal, y predomina la hepatomegalia, la toxocariosis es una posibilidad. Si predomina la esplenomegalia, los principales diagnósticos a considerar son una leishmaniasis visceral y la esplenomegalia malarica hipereactiva.

Síndromes nefrourológicos

El espectro de afectación va desde la lesión renal aguda a glomerulonefritis, amiloidosis y neoplasias secundarias. Lo producen tanto helmintos (*S. haematobium*, filarias) como protozoos (malaria y *Leishmania* spp.). Las principales parasitosis que afectan a la vía urinaria son *S. haematobium* y las filariosis linfáticas.

Síndromes neurológicos

La afectación neurológica debida a parasitosis es muy variada (tabla 2)²⁹. Dentro de las formas agudas que afectan al SNC destaca la malaria. Aunque excepcional, conviene mencionar dentro de las formas subagudas y/o crónicas a la tripanosomiasis africana. La epilepsia parcial es una manifestación habitual de la neurocisticercosis, responsable frecuente de casos de inicio tardío en áreas endémicas³⁰. La mielopatía es un cuadro muy prevalente en los trópicos, siendo los principales agentes helmintos como *Schistosoma* spp., *Paragonimus* spp., *Gnathostoma spinigerum* y la neurocisticercosis.

Síndromes reumatológicos

Algunos cuadros importados de poliartritis son causados por filarias, esquistosomas y cestodos. La triquinosis puede producir un cuadro de miopatía. Es obligatorio el cribado de estrongiloidosis y enfermedad de Chagas antes de iniciar tratamientos inmunosupresores.

Síndromes oftalmológicos

Numerosos parásitos pueden producir conjuntivitis, queratitis, uveítis/retinitis y lesiones en córnea, conjuntiva y párpados (tabla 2). La oncocercosis es una de las principales causas de ceguera en países endémicos. El edema bupalpebral unilateral con conjuntivitis (signo de Romaña) en el lugar de inoculación es característico de *T. cruzi*, y la visualización del gusano en la conjuntiva de la loaosis.

Síndromes otorrinolaringológicos

Las parasitosis a nivel otorrinolaringológico son infrecuentes, y pueden cursar con tos seca, irritativa, estridor y síntomas asfícticos. Hay que tener en cuenta la singamosis, habitual en Sudamérica y áreas del Pacífico, por consumo de verduras crudas contaminadas por gusanos adultos de *Syngamus laryngeus*. También el *halzoun*, característico de Oriente Medio³¹, que se adquiere al ingerir hígado de animales crudo o poco cocinado. Su etiología se achacó inicialmente a *Fasciola hepatica*, pero posteriormente se han descrito casos por *Dicrocoelium dendriticum* y *Linguatula serrata*.

Síndrome cutáneo

Es un grupo de enfermedades muy amplio, cuyo estudio pormenorizado excede a este artículo^{32,33}. Hay que tener en cuenta lesiones por ectoparásitos como *Sarcoptes scabiei* y la pulga *Tunga penetrans*; miasis migratorias producidas por moscas del ganado y forunculoides por *Dermabacter hominis* y *Cordylobia anthropophaga*; helmintosis como uncinarias que causan el cuadro de *larva migrans cutánea*,

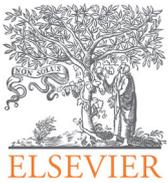
habitual en regiones tropicales (Brasil, África, Sur y Sudeste asiático) y la larva *currens* por *S. stercoralis*. También causan lesiones cutáneas la gnatostomiasis, oncocercosis, el edema de Calabar por *L. loa* y los cuadros de linfangitis aguda por *W. bancrofti*, *B. malayi* y *Brugia timori*. Entre los protozoos destacan las formas cutánea y mucocutánea de leishmaniasis.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- INE Instituto Nacional de Estadística. Movimientos migratorios exteriores – Provisionales 2016. Disponible en: http://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736177000&menu=ultiDatos&idp=1254735573002
- González-Moreno O, Domingo L, Teixidor J, Gracenea M. Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitol Res.* 2011;108:87-93.
- Belhassen-García M, Pardo-Lledías J, Pérez Del Villar L, Velasco-Tirado V, Siller Ruiz M, Cordero-Sánchez M, et al. Screening for parasite infections in immigrant children from low-income countries. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35:27-32.
- Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategias Básicas de Abordaje de las Enfermedades Infecciosas en Inmigrantes, Viajeros e Inmigrantes Viajeros. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social; 2009.
- Committee on the Protection of the Rights of All Migrant Workers and Members of their Families, General Comment No 1, U.N. Doc. CMW/C/GC1 (2011). Disponible en: <http://www1.umn.edu/humanrts/cmw/gencom1.html>
- Buonfrate D, Requena-Méndez A, Angheben A, Muñoz J, Gobbi F, Van den Ende J, et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infectious Diseases.* 2013;13:78.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Overseas Presumptive Treatment of Strongyloidiasis, Schistosomiasis, and Soil-Transmitted Helminth Infections. Disponible en: <https://www.cdc.gov/immigrantrefugee-health/guidelines/overseas/intestinal-parasites-overseas.html#summary>
- Muenning P, Pallin D, Sell RL, Chan M-S. The cost effectiveness of strategies for the treatment of intestinal parasites in immigrants. *N Engl J Med.* 1999;340:773-9.
- Pérez-Arellano J, Carranza-Rodríguez C. Estrategias de cribado en población inmigrante recién llegada a España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:45-52.
- Goterris L, Bocanegra C, Serre-Delcor N, Moure Z, Treviño B, Zarzuela F, et al. Screening of parasitic diseases in the asymptomatic immigrant population. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 Suppl 3:25-31.
- Monge-Maillo B, López-Vélez R, Norman FF, Ferrere-González F, Martínez-Pérez A, Pérez-Molina JA. Screening of imported infectious diseases among asymptomatic sub-Saharan African and Latin American immigrants: a public health challenge. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:848-56.
- Branda JA, Lin TY, Rosenberg ES, Halpern EF, Ferraro MJ. A rational approach to the stool ova and parasite examination. *Clin Infect Dis.* 2006;42:972-8.
- Campo Polanco L, Gutiérrez LA, Cardona Arias J. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013). *Rev Esp Salud Pública.* 2014;88:581-600.
- Danso-Appiah A, Minton J, Boamah D, Otchere J, Asmah RH, Rodgers M, et al. Accuracy of point-of-care testing for circulatory cathodic antigen in the detection of Schistosoma infection: systematic review and meta-analysis. *Bull World Health Organ.* 2016;94:522-33A.
- Pottie K, Greenaway C, Feightner J, Welch V, Swinkels H, Rashid M, et al. Evidence-based clinical guidelines for immigrants and refugees. *CMAJ.* 2011;183:E824-925.
- Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis an epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:371-418.
- Fernández-Soto P, Gandasegui Arahuetes J, Sánchez Hernández A, López Abán J, Vicente Santiago B, Muro A. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3126.
- Lucchi NW, Gaye M, Diallo MA, Goldman IF, Ljolje D, Deme AB, et al. Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites. *Sci Rep.* 2016;6:36808.
- Rowland M, Nosten F. Malaria epidemiology and control in refugee camps and complex emergencies. *Ann Trop Med Parasitol.* 2001;95:741-54.
- Domestic Refugee Health Guidelines: Malaria. U.S. Department of Health and Human Services; Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases; Division of Global Migration and Quarantine; 2012.
- Muñoz J, Rojo-Marcos G, Ramírez-Olivencia G, Salas-Coronas J, Treviño B, Pérez-Arellano J-L, et al. Diagnosis and treatment of imported malaria in Spain: recommendations from the Malaria Working Group of the Spanish Society of Tropical Medicine and International Health. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:e1-13.
- Díaz-Menéndez M, Norman F, Monge-Maillo B, Pérez-Molina JA, López-Vélez R. Las filariasis en la práctica clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Supl 5:27-37.
- Vilajeliu A, De las Heras P, Ortiz G, Pinazo MJ, Gascón J, Bardají A. Imported parasitic diseases in the immigrant population in Spain. *Rev Esp Salud Pública.* 2014;88:783-802.
- García LS. Diagnostic medical parasitology. 6th ed. Washington DC: ASM Press; 2016.
- Pardo J, Pérez-Arellano JL, Galindo I, Belhassen M, Cordero M, Muro A. Diagnosing imported helminthiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:329-35.
- Ramírez-Olivencia G, Herrero MD, Subirats M, De Juanes JR, Peña JM, Puente S. Imported malaria in adults. Clinical, epidemiological and analytical features. *Rev Clin Esp.* 2012;212:1-9.
- Fernandes CJ, Jardim CV, Hovnanian A, Hoette S, Morinaga LK, Souza R. Schistosomiasis and pulmonary hypertension. *Expert Rev Respir Med.* 2011;5:675-81.
- Cordero M, Muñoz MR, Muro A, Simón F, Perera ML. Small calcified nodule: an undescribed radiologic manifestation of human pulmonary dirofilariasis. *J Infect Dis.* 1992;165:398-9.
- Carpio A, Romo ML, Parkhouse RME, Short B, Dua T. Parasitic diseases of the central nervous system: lessons for clinicians and policy makers. *Expert Rev Neurother.* 2016;16:401-14.
- Esquivel A, Diaz-Otero F, Gimenez-Roldan S. Growing frequency of neurocysticercosis in Madrid (Spain). *Neurologia.* 2005;20:116-20.
- Yazdani R, Sharifi I, Bamorovat M, Mohammadi MA. Human linguatulosis caused by *L. serrata* in the City of Kerman, South-eastern Iran. *Iran J Parasitol.* 2014;9:282-5.
- Lupi O, Downing C, Lee M, Pino L, Bravo F, Giglio P, et al. Mucocutaneous manifestations of helminth infections: Nematodes. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73:929-44.
- Lupi O, Downing C, Lee M, Bravo F, Giglio P, Woc-Colburn L, et al. Mucocutaneous manifestations of helminth infections: Trematodes and cestodes. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73:947-57.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Bacilos gramnegativos de crecimiento lento: grupo HACEK, *Capnocytophaga* y *Pasteurella*

José Leiva^{a,*} y José Luís del Pozo^{a,b}

^aServicio de Microbiología, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España

^bÁrea de Enfermedades Infecciosas, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España

RESUMEN

Palabras clave:

HACEK
Haemophilus
Aggregatibacter
Cardiobacterium
Eikenella
Kingella
Pasteurella
Capnocytophaga
 Bacteriemia
 Endocarditis

Las bacterias del grupo HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), *Pasteurella* y *Capnocytophaga* son las bacterias gramnegativas de crecimiento lento que con mayor frecuencia causan infecciones en el ser humano. Forman parte de la microbiota del tracto respiratorio superior y genitourinario del ser humano y de animales, y pueden causar infecciones en cualquier localización, pero fundamentalmente de piel y tejidos blandos, así como bacteriemia y endocarditis. Su clasificación taxonómica es compleja y está en constante revisión. Son bacterias nutricionalmente exigentes, y para el desarrollo de colonias visibles requieren agar sangre y agar chocolate, una atmósfera aerobia, generalmente enriquecida en CO₂ y una incubación de 48 h. La identificación fenotípica de especie es complicada y no siempre es posible, ya que requiere múltiples sustratos que normalmente no están disponibles en los laboratorios de rutina, ni en los sistemas automatizados. La aplicación de las técnicas moleculares y proteómicas ha permitido una mejor identificación de estas bacterias. El tratamiento de estas infecciones se encuentra con el problema de que los datos de sensibilidad a los agentes antimicrobianos son limitados; no obstante, de los datos disponibles se conoce que amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de segunda y tercera generaciones y fluoroquinolonas son generalmente activas frente a ellas.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Fastidious gram-negative rods: HACEK group, *Capnocytophaga* and *Pasteurella*

ABSTRACT

Keywords:

HACEK
Haemophilus
Aggregatibacter
Cardiobacterium
Eikenella
Kingella
Pasteurella
Capnocytophaga
 Bacteraemia
 Endocarditis

Bacteria from the HACEK group (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), *Pasteurella* and *Capnocytophaga* are slow-growing gram-negative bacteria that most frequently cause infections in humans. They are part of the microbiota of the upper respiratory and genitourinary tracts of humans and animals, and can cause infections in any location, although mainly skin and soft tissue infections, as well as bacteraemia and endocarditis. Taxonomic classification is complex and under constant review. These are nutritionally demanding bacteria that require blood and chocolate agar, an aerobic atmosphere, generally CO₂-enriched, and 48 h incubation for the development of visible colonies. Phenotypic identification at the species level is complicated and not always possible because it requires multiple substrates that are not normally available in routine laboratories or in automated systems. Application of molecular and proteomic techniques has enabled better identification of these bacteria. Treatment of related infections is hindered by a lack of data on susceptibility to antimicrobial agents. However, evidence suggests that amoxicillin-clavulanic acid, second- and third-generation cephalosporins and fluoroquinolones are generally active against these bacteria.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jleiva@unav.es. (J. Leiva León).

Introducción

Las bacterias denominadas de crecimiento lento, una de las traducciones del término *fastidious*, son aquellas que requieren, para un crecimiento óptimo, medios de cultivo suplementados como el agar sangre o el agar chocolate y generalmente una atmósfera aerobia enriquecida en CO₂, y aún en estas condiciones necesitan al menos 48 h para dar lugar a colonias visibles¹⁻³. La mayor parte de las revisiones sobre las bacterias gramnegativas de crecimiento lento incluyen las que forman parte de la microbiota del tracto respiratorio superior y genitourinario del ser humano y de animales, y que en el ser humano pueden dar lugar a infecciones en cualquier localización, pero fundamentalmente infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia y endocarditis. Incluyen un gran número de géneros, entre ellos los incluidos en el denominado grupo HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), *Pasteurella* y *Capnocytophaga*, pero también otros géneros como *Actinobacillus*, *Chromobacterium*, *Dysgonomonas*, *Simonsiella*, *Streptobacillus* y *Suttonella*. En estas revisiones se cumple el aforismo de que “ni son todas las que están, ni están todas las que son”. No son todas las que están porque algunas de ellas como *Haemophilus parainfluenzae* y algunas especies de *Pasteurella* dan lugar a colonias visibles en 24 h; tampoco están todas las que son, porque siendo estrictos en la definición también se podrían incluir géneros como *Helicobacter*, *Brucella* y *Bartonella*. Por todo ello, dado el elevado número de géneros, y aún cumpliéndose el aforismo, en esta revisión se han incluido las bacterias del grupo HACEK, *Capnocytophaga* y *Pasteurella*.

Situación taxonómica

El grupo HACEK es un acrónimo que inicialmente incluía a los géneros *Haemophilus* (fundamentalmente las especies *H. parainfluenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* y *Haemophilus segnis*), *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*, pero una revisión taxonómica del año 2006⁴ creó el género *Aggregatibacter*, que incluía *Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter paraphrophilus* y *Aggregatibacter segnis* (las 3 especies antes incluidas en el género *Haemophilus*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente incluida en el género *Actinobacillus*), por lo que el grupo HACEK actualmente incluye a los géneros *Haemophilus* (especies distintas de *H. influenzae*, fundamentalmente *H. parainfluenzae* y *Haemophilus parahaemolyticus*), *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*.

Además de *Aggregatibacter*, la familia Pasteurellaceae incorpora los géneros *Haemophilus* y *Pasteurella*⁵. El género *Haemophilus* además de *H. influenzae* incluye las especies *H. parainfluenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus paraphrohaemolyticus*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus pittmaniae*, *Haemophilus ducreyi* y *Haemophilus sputorum*. El género *Aggregatibacter* está formado por las especies ya citadas *A. actinomycetemcomitans*, *A. aphrophilus* y *A. segnis*. La estructura taxonómica del género *Pasteurella* es compleja. Actualmente, y basado en técnicas de secuenciación de distintos genes, el género *Pasteurella sensu stricto* incluye *Pasteurella multocida* subespecies *multocida*, *gallicida* y *septica*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis* y *Pasteurella stomatitis*. El resto de especies han sido designadas como especies *incertae sedis* pendientes de asignación a géneros nuevos o preexistentes. Estas otras incluyen *Pasteurella aerogenes*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella betti*, *Pasteurella caballii*, *Pasteurella anatis*, *Pasteurella mairii*, *Pasteurella testudinis*, *Pasteurella skyensis*, *Pasteurella langaensis*, *Pasteurella lyphangitidis*, *Pasteurella trehalosis*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium*⁵.

Eikenella y *Kingella* están incluidas en la familia Neisseriaceae, en la subclase β de Proteobacteria. El género *Eikenella* posee una sola especie, *Eikenella corrodens*. El género *Kingella* comprende 4 especies *Kingella kingae*, *Kingella denitrificans*, *Kingella oralis* y *Kingella*

potus, de las que las 2 primeras son las que más frecuentemente causan patología en el ser humano⁶.

Cardiobacterium se incluye en la familia Cardiobacteriaceae e incluye 2 especies principales, *Cardiobacterium hominis*⁷ y *Cardiobacterium valvarum*⁸.

El género *Capnocytophaga* perteneciente a la familia Flavobacteriaceae incluye 8 especies. Seis especies forman parte de la microbiota oral humana, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Capnocytophaga ochracea* y *Capnocytophaga sputigena* y 2 son patógenos zoonóticos que se encuentran en la cavidad oral de perros y gatos, *Capnocytophaga canimorsus* y *Capnocytophaga cynodegmi*^{9,10}.

Manifestaciones clínicas

Estos microorganismos se han implicado en numerosas infecciones, entre las que destacan la endocarditis y la bacteriemia (tabla 1). A continuación se detalla la implicación clínica de cada una de las especies incluidas en esta revisión.

Haemophilus spp. (excepto *Haemophilus influenzae*)

H. parainfluenzae, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus* y *H. pittmaniae* forman parte del microbioma respiratorio y son causa relativamente infrecuente de infección en humanos⁵.

Se han descrito casos de endocarditis sobre válvulas cardíacas nativas y protésicas, así como infecciones asociadas a marcapasos y desfibriladores implantables por *H. parainfluenzae*^{11,12}. *H. parainfluenzae* también se ha implicado en casos de bronquitis, sinusitis, otitis media, abscesos cerebrales, reagudizaciones de pacientes con EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), neumonías, abscesos cerebrales, infecciones de piel y partes blandas e infecciones osteoarticulares¹³⁻¹⁵. *H. parainfluenzae* puede también formar parte de la microbiota del tracto genital y se han descrito casos de corioamnionitis y sepsis neonatal precoz¹⁶. *H. parainfluenzae* puede ser causa de infecciones de la vía biliar, de hecho, se han descrito casos de infecciones secundarias a procedimientos endoscópicos^{17,18}. El resto de especies son raramente causa de infección en humanos (tabla 1).

Aggregatibacter spp.

A. aphrophilus forma parte de la microbiota orofaríngea y puede causar bacteriemia y endocarditis sobre válvula protésica o nativa^{19,20}. Además, se han descrito casos de infecciones de cabeza y cuello (sinusitis, otitis media, epiglotitis, abscesos cerebrales, ventriculitis o meningitis) por *A. aphrophilus*^{21,22}. También se han descrito infecciones de carácter habitualmente hematógeno en otras localizaciones (osteomielitis, espondilodiscitis o infecciones intraabdominales)²³⁻²⁶.

A. actinomycetemcomitans forma parte también de la microbiota de la cavidad oral. El serotipo b se asocia con mayor frecuencia con la enfermedad periodontal grave²⁷. Este microorganismo produce una potente leucotoxina y otros factores de virulencia que contribuyen a su papel como patógeno periodontal. La mayor parte de cepas son sensibles a tetraciclinas, sin embargo, se han descrito cepas portadoras de plásmidos de resistencia *tetB*^{28,29}. *A. actinomycetemcomitans* también se ha asociado con endocarditis, bacteriemia e infecciones de herida quirúrgica³⁰. La endocarditis por este microorganismo suele ocurrir en pacientes con una valvulopatía previa (estenosis aórtica, válvula aórtica bicúspide, defectos de cierre auriculoventriculares, fiebre reumática)³⁰⁻³², aunque también se han descrito casos de endocarditis sobre válvulas protésicas. El curso clínico de la endocarditis suele ser crónico e indolente, aunque puede complicarse incluso con la muerte³⁰. Se han descrito infecciones por contigüidad desde la cavidad oral como abscesos cerebrales, infecciones pleuropulmonares, abscesos subfrénicos, osteomielitis mandibular y linfadenitis cervi-

Tabla 1Principales infecciones producidas por las bacterias del grupo HACEK, *Pasteurella* y *Capnocytophaga*

Microorganismo	Infección
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Infecciones del tracto respiratorio; epiglotitis; neumonía; reagudizaciones de EPOC; bacteriemia; endocarditis; sinusitis; meningitis; absceso cerebral; infecciones del tracto urinario en niños; peritonitis; artritis; osteomielitis
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	Bacteriemia; neumonía; absceso cerebral
<i>Haemophilus pittmaniae</i>	Infección respiratoria
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Endocarditis; endoftalmitis; infección de herida quirúrgica; periodontitis; osteomielitis; absceso epidural
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	Meningitis; absceso epidural; linfadenitis; infección osteoarticular; espondilodiscitis; bacteriemia; endocarditis; endoftalmitis; canaliculitis; apendicitis; absceso hepático; empiema
<i>Aggregatibacter segnis</i>	Endocarditis
<i>Cardiobacterium hominis</i>	Endocarditis; bacteriemia; artritis; infección neonatal
<i>Cardiobacterium valvarum</i>	Endocarditis
<i>Eikenella corrodens</i>	Infecciones de piel y partes blandas (en UDVP); infecciones tras mordedura; canaliculitis; conjuntivitis; queratitis; endoftalmitis; tromboflebitis supurada; endocarditis; neumonía; empiema; abscesos pulmonares; infecciones intraabdominales y pélvicas; bacteriemia; sepsis neonatal; osteomielitis; artritis; abscesos vulvares; corioamnionitis; discitis; absceso epidural; aneurismas micóticos; periodontitis; infección urinaria; absceso cerebral; meningitis crónica; absceso hepático
<i>Kingella kingae</i>	Artritis; bacteriemia; osteomielitis; espondilodiscitis; bursitis; tenosinovitis; endocarditis; neumonía; celulitis; queratitis; meningitis; peritonitis; infección urinaria
<i>Kingella denitrificans</i>	Endocarditis; bacteriemia; vaginitis; corioamnionitis; empiema pleural; absceso retrofaríngeo; úlcera corneal
<i>Kingella oralis</i>	Gingivostomatitis
<i>Kingella potus</i>	Infección tras mordedura
<i>Capnocytophaga</i> spp. (origen humano)	Bacteriemia; endocarditis; queratitis, conjuntivitis, endoftalmitis y úlceras corneales; sinusitis; abscesos pericárdicos, pulmonares y subfrénicos; artritis séptica y osteomielitis; abscesos cerebrales, intracraneales y vertebrales; abscesos abdominales; infecciones perinatales, corioamnionitis y partos prematuros
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	Infección de heridas secundarias a mordeduras de animales; bacteriemia; meningitis; absceso cerebral; endocarditis; peritonitis; colecistitis; neumonía; artritis; osteomielitis; discitis; abscesos; infecciones asociadas a injertos endovasculares; infecciones oculares
<i>Pasteurella multocida</i>	Infección de piel y partes blandas (especialmente tras mordedura de perros o gatos); endocarditis; meningitis; infecciones respiratorias; infección de injertos vasculares
<i>Pasteurella dagmatis</i>	Endocarditis; bacteriemia; osteomielitis vertebral; espondilodiscitis; infecciones respiratorias; infección de piel y partes blandas
<i>Pasteurella gallinarum</i>	Meningitis; endocarditis; bacteriemia

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral.

ca³³⁻³⁵. La diseminación hematogena desde cualquiera de estos focos puede resultar en abscesos epidurales, abscesos intraabdominales, espondilodiscitis, artritis séptica o endoftalmitis³⁶⁻³⁸.

A. segnis ocasiona muy raramente infecciones en humanos, habiéndose descrito casos de enfermedad periodontal, bacteriemia, endocarditis o infecciones intraabdominales³⁹⁻⁴¹.

Cardiobacterium spp.

Este microorganismo forma parte de la microbiota habitual del tracto respiratorio, pero debido a su crecimiento lento en medios de cultivo, raramente se aísla de muestras respiratorias. *C. hominis* es un microorganismo poco virulento, que se ha implicado casi exclusivamente en casos de endocarditis⁴²⁻⁴⁴. También se han descrito casos de endocarditis sobre cables de marcapasos^{44,45}. La endocarditis por este microorganismo suele tener un curso insidioso con síntomas poco floridos, por lo que el diagnóstico suele ser tardío, lo que complica el pronóstico. Casi todos los pacientes tienen el antecedente de una boca séptica o han sufrido algún tipo de procedimiento odontológico. *C. hominis* tiende a formar vegetaciones grandes y friables, de manera que la complicación más grave son las embolias sépticas, los aneurismas micóticos y la insuficiencia cardíaca congestiva. El diag-

nóstico suele confirmarse por aislamiento del microorganismo en sangre. Es muy raro aislar este microorganismo de una muestra diferente a la sangre, aunque se ha descrito un caso de osteomielitis vertebral⁴⁶ y otro de peritonitis asociada a diálisis peritoneal⁴⁷.

C. valvarum se ha implicado en casos de endocarditis sobre válvulas nativas (sobre todo válvulas aórticas bicúspides) y mecánicas^{8,48}. La endocarditis por *C. valvarum* suele originar vegetaciones grandes y una gran destrucción valvular⁴⁹⁻⁵¹.

Eikenella corrodens

E. corrodens forma parte de la microbiota normal de la orofaringe y del tracto respiratorio superior. Puede ocasionar patología periodontal en forma de abscesos periapicales o infecciones del canal nervioso⁵². También se ha implicado en infecciones de cabeza y cuello incluyendo infecciones oculares (celulitis orbitaria, úlceras corneales, endoftalmitis, abscesos lacrimales), mastoiditis y abscesos submandibulares y tiroideos⁵³. *E. corrodens* también se ha implicado en infecciones pleuropulmonares (incluyendo abscesos pulmonares, neumonías y empiemas) en inmunodeprimidos, en pacientes con enfermedades pulmonares de base y en los pacientes que sufren aspiraciones⁵⁴.

A partir de focos periodontales u otorrinolaringológicos, *E. corrodens* puede alcanzar el sistema nervioso central ocasionando meningitis, abscesos cerebrales, empiemas subdurales o abscesos paraespinales⁵⁵. La endocarditis por este microorganismo es excepcional y ocurre fundamentalmente en inmunocomprometidos, en usuarios de drogas por vía parenteral o en pacientes con patología valvular previa⁵⁶. *E. corrodens* puede ocasionar abscesos subcutáneos, celulitis, osteomielitis, artritis séptica y bacteriemia en usuarios de drogas por vía parenteral⁵⁷. *E. corrodens* puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal y se ha aislado en pacientes con peritonitis, abscesos hepáticos, esplénicos y pancreáticos⁵⁸. *E. corrodens* también puede producir infecciones ginecológicas como corioamnionitis, endometritis y cervicitis asociadas con dispositivos intrauterinos⁵⁹.

Kingella spp.

Kingella spp. forma parte de la microbiota habitual del tracto respiratorio y genitourinario, especialmente en niños de entre 6 meses y 4 años, pudiéndose diseminar en esta población por vía respiratoria⁶⁰⁻⁶². *Kingella spp.* ha sido clásicamente una causa infrecuente de endocarditis, sin embargo, en los últimos años, *K. kingae* ha emergido como un patógeno relevante en pacientes pediátricos en los que se ha descrito como agente causal de bacteriemias primarias e infecciones osteoarticulares^{63,64}. La puerta de entrada de estas bacteriemias es probablemente la mucosa orofaríngea. Las infecciones osteoarticulares son la manifestación clínica más frecuente en niños^{65,66}. Se han descrito artritis sépticas, osteomielitis, discitis y tenosinovitis. Tras la introducción de la vacuna frente a *H. influenzae*, *Kingella spp.* ha sustituido a este microorganismo como el bacilo gramnegativo que causa más frecuentemente infecciones osteoarticulares en menores de 3 años⁶⁷. La artritis séptica por *Kingella spp.* suele ser monoarticular, fundamentalmente afecta a la rodilla, la cadera o al tobillo⁶³. La osteomielitis por *Kingella spp.* suele afectar a huesos largos como el fémur, la tibia o el radio. Aunque más infrecuentemente, *Kingella spp.* también se ha implicado en infecciones osteoarticulares en adultos⁶⁸. De manera mucho más infrecuente, *Kingella spp.* puede ocasionar bacteriemia y endocarditis^{69,70}. La endocarditis ocurre habitualmente en adultos con enfermedad cardíaca predisponente o con válvulas cardíacas protésicas. Se han descrito complicaciones como abscesos paravalvulares, abscesos pericárdicos, fenómenos embólicos, aneurismas micóticos, infartos pulmonares, shock séptico e insuficiencia cardíaca congestiva^{71,72}. La bacteriemia por *Kingella spp.* sin endocarditis se ha descrito en pacientes inmunocompetentes tras manipulaciones dentales o en pacientes sometidos a radio o quimioterapia. *Kingella spp.* también puede causar infecciones del tracto urinario⁷³. Otras especies como *K. denitrificans*, *K. oralis* y *K. potus* ocasionan patología humana de manera más infrecuente, y se han descrito casos de corioamnionitis, empiema, queratitis e infecciones de piel y partes blandas⁷⁴⁻⁷⁹.

Capnocytophaga de origen humano

C. gingivalis, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. leadbetteri*, *C. ochracea* y *C. sputigena* forman parte de la microbiota de la cavidad oral humana. Muchos de los procesos clínicos atribuidos a este género tienen su origen en la cavidad oral, sin embargo, también se han aislado especies de *Capnocytophaga* en el tracto genital femenino, que se han visto implicadas en infecciones intrauterinas, amnionitis e infecciones perinatales en niños prematuros⁸⁰.

C. ochracea, *C. sputigena* y *C. gingivalis* actúan como patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, produciendo bacteriemias que pueden resultar fatales⁸⁰. La posibilidad de una sepsis por *Capnocytophaga* se debe considerar siempre en la evaluación de un paciente leucémico que, en el curso de una neutropenia⁸¹, presente un cuadro febril, especialmente si en el mismo hay mucositis o ulceraciones orales. En una revisión de pacientes con este tipo de

bacteriemias⁸², la mayoría padecía una leucemia mieloide aguda⁸³ o una leucemia linfocítica aguda⁸⁴, siendo menos frecuentes los casos asociados a tumores sólidos u otros procesos como mieloma múltiple⁸⁵, lupus eritematoso sistémico en tratamiento con ciclofosfámidas⁸⁶, trasplante de médula^{87,88}, artritis reumatoide con tratamiento biológico⁸⁹, etc.

En contraste, en los pacientes inmunocompetentes, los cuadros infecciosos atribuidos a estas especies son menos frecuentes y las formas clínicas de presentación tienen, por lo general, otras localizaciones que incluyen queratitis⁹⁰, endoftalmitis⁹¹, úlceras corneales, conjuntivitis⁹², empiema⁹³, abscesos pericárdicos⁹⁴, mediastinitis, abscesos pulmonares y subfrénicos⁹⁵, endocarditis⁹⁶⁻⁹⁸, sinusitis⁹², celulitis facial⁹⁹, artritis séptica y osteomielitis^{100,101}, abscesos vertebrales¹⁰², abscesos cerebrales¹⁰³, abscesos intracraneales¹⁰⁴, abscesos abdominales, infecciones de heridas⁹². También se han descrito infecciones perinatales, corioamnionitis y partos prematuros^{105,106} y sepsis neonatal¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

En niños, al igual que en los adultos, la sepsis no asociada a una inmunodeficiencia es rara, pero se han descrito aislamientos de *Capnocytophaga* a partir de abscesos cerebrales¹¹¹, conjuntivitis^{112,113} y artritis séptica¹¹⁴, entre otras infecciones.

Capnocytophaga de origen animal

C. canimorsus puede formar parte de la microbiota orofaríngea de gatos y perros y puede causar infecciones graves en el ser humano. Se han descrito más de 100 casos de infección por este microorganismo¹¹⁵⁻¹¹⁷. La mayor parte de estas infecciones han afectado a pacientes adultos. El 80% de estos tenía algún tipo de enfermedad de base predisponente (asplenia, enfermedad de Hodgkin, púrpura trombocitopénica idiopática, alcoholismo, tratamiento corticoideo o enfermedad pulmonar crónica), siendo la asplenia la patología subyacente más frecuente. El tipo de infección más frecuente es la infección de piel y partes blandas secundaria a mordeduras o arañazos de animales (sobre todo perros y gatos). En ocasiones se puede asociar a fracaso multiorgánico, fiebre, trombopenia, hipotensión y fracaso renal. De manera secundaria se han descrito cuadros de meningitis¹¹⁸ y endocarditis¹¹⁹. En el 50% de los pacientes con bacteriemia o endocarditis aparecen lesiones cutáneas tipo petequias, exantema maculopapular, formación de escaras o eritemas dolorosos que pueden evolucionar a necrosis cutáneas. También se ha implicado con bacteriemia en pacientes neutropénicos y cirróticos, e incluso en cuadros de coagulación intravascular diseminada en pacientes esplenectomizados. Otras manifestaciones clínicas descritas son meningitis, absceso cerebral, endocarditis, peritonitis, colecistitis, neumonía, artritis, osteomielitis, discitis y abscesos, además de infecciones asociadas a injertos endovasculares e infecciones oculares. La mortalidad global asociada a infecciones por este microorganismo se acerca al 25%.

Pasteurella spp.

Pasteurella spp. puede formar parte de la microbiota habitual de la nasofaringe y del tracto gastrointestinal de animales domésticos (perros y gatos) y salvajes. Es muy raro encontrar este microorganismo formando parte de la microbiota del tracto respiratorio del ser humano. *P. multocida* es una causa frecuente de infección de piel y partes blandas después de una mordedura de perro o gato. Este tipo de infecciones son agudas y progresan rápidamente ocasionando incluso cuadros de bacteriemia. Se han descrito una treintena de casos de endocarditis por *Pasteurella spp.*¹²⁰⁻¹²². En más del 40% de los casos descritos se había registrado el antecedente de contacto cercano con un perro o gato. La mortalidad de la endocarditis por *Pasteurella spp.* se aproxima al 30%, y en la mayoría de los casos está ocasionada por un retraso en el diagnóstico. Otras especies como *P. dagmatis* o *P. gallinarum* pueden ocasionar también endocarditis¹²¹ (tabla 1).

Morfología microscópica

La característica más frecuente en todas las especies es el pleomorfismo. *H. parainfluenzae* aparece en la tinción de Gram como bacilos pequeños o en formas filamentosas, en cambio *H. parahaemolyticus* como bacilos de tamaño corto o medio. Las bacterias incluidas en el género *Aggregatibacter* se presentan como bacilos gramnegativos, aunque ocasionalmente exhiben formas cocoides y filamentosas. En el caso de *Cardiobacterium*, *C. hominis* aparece como bacilos rectos o en formas filamentosas, que se disponen en cadenas cortas, parejas o rosetas. Exhibe una tinción de Gram irregular, y algunas partes de la bacteria pueden teñirse como grampositivo, mientras que *C. valvarum* es un bacilo gramnegativo corto o pleomórfico, que se decolora fácilmente. *E. corrodens* es un bacilo o cocobacilo gramnegativo pequeño, recto, delgado y con los extremos redondeados (fig. 1A). *Kingella* spp. se presenta en parejas o cadenas cortas (4 a 8) de bacilos o cocobacilos gramnegativos rechonchos con los extremos cuadrados. Tienden a resistir a la decoloración y presentan una coloración desigual en la tinción de Gram, pudiendo aparecer algunas zonas de la bacteria como grampositivas⁶. *Capnocytophaga* spp. son bacilos gramnegativos fusiformes, largos, rectos o ligeramente curvados (fig. 1B). En los cultivos viejos, dan lugar a pleomorfismo con células grandes en forma de cocos. *Pasteurella* spp. son bacilos o cocos gramnegativos pequeños, aislados, en parejas o cadenas cortas. Con frecuencia presentan tinción bipolar. Las especies relacionadas tienen forma más bacilar.

Cultivo

Para el cultivo de este grupo de bacterias se requiere agar sangre y agar chocolate y, además, en el caso de muestras potencialmente contaminadas con microbiota normal, un medio selectivo. Para la recuperación de las bacterias del grupo HACEK de muestras de sangre es suficiente la incubación de 5 días en los sistemas de hemocultivos automatizados³.

Las especies de *Haemophilus* crecen en agar chocolate u otros medios de cultivo que contienen hemina (factor X) y NAD (factor V) dando lugar a colonias lisas, planas o convexas, a veces ligeramente amarillentas. Todas las especies de *Haemophilus*, a excepción de *H.*

ducreyi, requieren factor V, pero solo *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. aegyptius* y *H. ducreyi* requieren factor X. La sangre de cordero contiene factor X y factor V, pero el factor V no está disponible por su localización intracelular y por la presencia en la sangre de enzimas NAD-glucohidrolasa que hidroliza el NAD. También se puede utilizar el medio enriquecido de Levinthal¹²³. El agar sangre de caballo y de conejo se utiliza para la detección de hemólisis en las especies hemolíticas y que no son capaces de crecer en agar sangre de cordero. Para el aislamiento a partir de muestras contaminadas se puede utilizar agar chocolate con bacitracina o agar sangre suplementado con factores X y V con bacitracina, este último medio permite identificar las especies hemolíticas. Otros medios selectivos adicionan al agar chocolate bacitracina, clindamicina y/o vancomicina¹²⁴. *Haemophilus* spp. es capaz de crecer en agar sangre alrededor de las colonias de *S. aureus* y otras bacterias dando lugar al fenómeno de satelitismo. *H. parainfluenzae* da lugar a morfologías coloniales muy variadas que pueden cambiar con la edad. Generalmente son planas, lisas y traslúcidas.

Aggregatibacter spp. requiere medios enriquecidos, pero no necesariamente hemina para crecer, y el crecimiento es mejorado con una atmósfera enriquecida al 5-10% de CO₂. Algunas cepas de *A. aphrophilus* y *A. segnis* requieren factor V, pero ninguna requiere factor X. *A. aphrophilus* después de 48-72 h de incubación en agar chocolate da lugar a colonias pequeñas de 0,5-1 mm de diámetro, convexas, opacas, granulares y con una débil pigmentación amarilla. En ausencia de CO₂ aparece pleomorfismo dando lugar a colonias grandes y pequeñas. Las colonias en agar chocolate de *A. segnis* son lisas o granulares, convexas, blanco grisáceas y opacas, su tamaño a las 48 h es de aproximadamente 0,5 mm⁴. *A. actinomycetemcomitans*, tras 48-72 h de incubación, da lugar en agar chocolate y agar sangre a colonias pequeñas, lisas, traslúcidas, no hemolíticas y de bordes ligeramente irregulares. Tras 5-7 días de incubación, las colonias pueden desarrollar un centro denso que parece una estrella de 5 o 6 puntas y que pican el agar. Se adhieren al agar y son difíciles de suspender. Para el aislamiento a partir de muestras contaminadas se han empleado medios selectivos con bacitracina y vancomicina¹²⁵.

Cardiobacterium spp. es una bacteria anaerobia facultativa y requiere del 5-10% de CO₂ y una humedad incrementada para su desarrollo en agar sangre. Su temperatura óptima de crecimiento es 30-

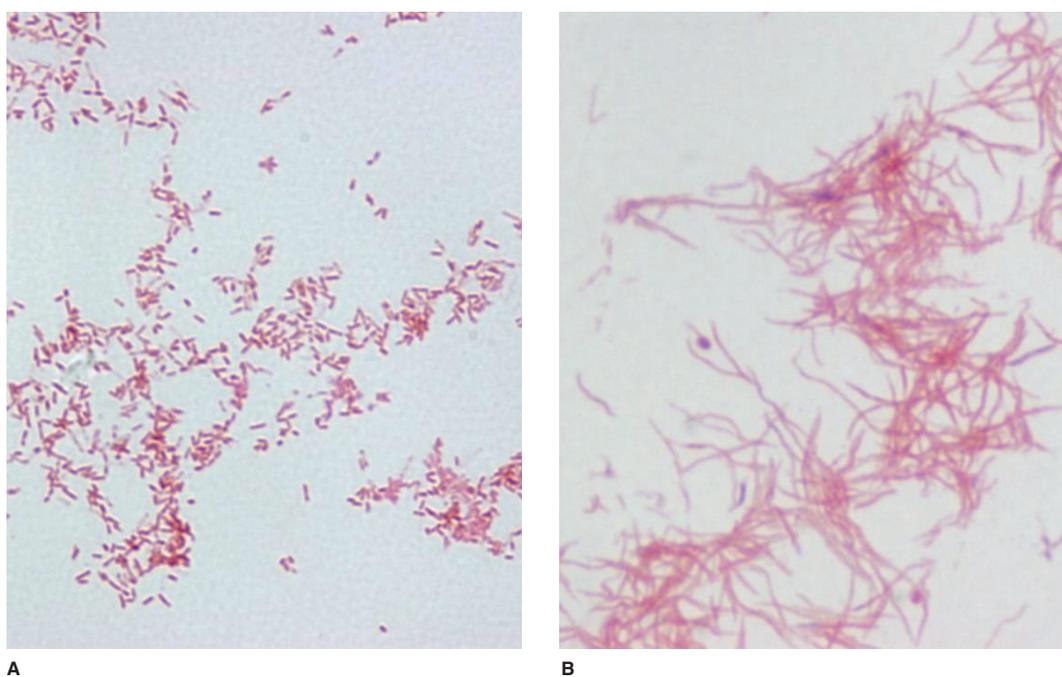


Figura 1. Morfología microscópica en la tinción de Gram de *Eikenella corrodens* (A) y *Capnocytophaga gingivalis* (B). (×1.000).

35 °C. Las colonias en agar sangre o agar chocolate tras 48-72 h de incubación son muy pequeñas (1 mm), lisas, brillantes y opacas. *C. hominis* requiere una incubación de 2 días para la aparición de colonias visibles mientras que *C. valvarum* requiere 3 días⁴⁹ y algunas cepas de ambas especies pueden presentar picadura en el agar, siendo más frecuente en agar chocolate que en agar sangre. Se aíslan principalmente de hemocultivos, donde crecen lentamente. La tinción de Gram de los frascos positivos puede no revelar microorganismos, pero el proceso de centrifugación diferencial (primero a bajas revoluciones para retirar las células sanguíneas y después a altas revoluciones para recoger las bacterias) permite la visualización de la bacteria en la tinción de Gram del sedimento¹²⁶.

Las cepas *E. corrodens* generalmente requieren hemina para crecer cuando la atmósfera de incubación no posee un 5-10% de CO₂¹²⁷. Son anaerobias facultativas y capnófilas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 °C. En agar sangre y agar chocolate dan lugar a pequeñas colonias de 0,5-1 mm de diámetro después de 48 h de incubación, que se pueden extender dando un crecimiento plano. A veces pueden presentar una morfología colonial distinta en ambos medios (fig. 2A). El 50% de los aislados pueden "picar" el medio de cultivo (producir una depresión en el agar) durante el crecimiento. Se pueden observar variantes "picadoras" y "no picadoras" en el mismo cultivo. Produce un pigmento amarillo pálido y la mayor parte de las cepas tienen olor a hipoclorito sódico (lejía). Aunque no es hemolítica se puede observar un ligero color verdoso alrededor de las colonias. Se ha usado un medio selectivo que contiene clindamicina para su aislamiento de muestras que contienen microbiota normal¹²⁸.

K. kingae es una bacteria anaerobia facultativa que crece en agar sangre y agar chocolate. En agar sangre produce una débil betahemólisis, que a veces solo se observa cuando se retira la colonia. *K. kingae* y *K. denitrificans* pueden "picar" el agar después de un tiempo prolongado de incubación, que también se observa mejor al retirar la colonia¹²⁹. También se desarrollan en agar de Thayer-Martin. El crecimiento mejora en una atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO₂, pero solo una pequeña proporción de cepas es estrictamente capnófila¹³⁰. Se han descrito variantes de colonias pequeñas en portadores nasofaríngeos sanos y raramente en enfermedad invasiva, lo que sugiere que estas variantes tienen la virulencia disminuida¹³¹.

El aislamiento de *K. kingae* de líquidos corporales y de material purulento puede ser difícil, porque estas muestras pueden ser inhibitorias. El uso de distintos medios de hemocultivos (Bactec, BacT/

Alert, Hémolin DUO, Isolator 1,5 Microbial Tube, medios de cultivo preparados) han mejorado significativamente la tasa de detección¹³⁰. Los subcultivos de los frascos de hemocultivos en agar sangre y chocolate crecen sin dificultad, lo que indica que los medios bacteriológicos de rutina soportan el crecimiento de *K. kingae*. Esta observación confirma que el líquido sinovial tiene propiedades antibacterianas, ejerciendo un efecto inhibitorio en *K. kingae*¹³², y la inoculación de pequeños volúmenes de exudado en un gran volumen de líquido contenido en los frascos de hemocultivos diluye este efecto inhibitorio del exudado y mejora el crecimiento de *K. kingae*^{130,133}. En 2 estudios en los que se inoculó líquido sinovial de pacientes con infección bacteriológicamente documentada en frascos de hemocultivos, solo se detectó la mitad de los casos, independientemente del sistema automatizado de hemocultivos utilizado^{67,134}. Lo que refleja que el aislamiento de *K. kingae* en medios de cultivo es problemático, aun en los frascos de hemocultivos, y que todavía no se conoce realmente por qué los sistemas de hemocultivos y los cultivos en caldo son mejores que los cultivos en medio sólido¹³⁵. Los resultados mejoran cuando se utilizan frascos de adultos en lugar de pediátricos y se adiciona sangre a los cultivos¹³⁶. Para el aislamiento de cultivos mixtos, se recomiendan medios que contengan clindamicina o vancomicina, así como el medio de Thayer-Martin^{133,137}.

El aislamiento primario de *Capnocytophaga* spp. requiere 5-10% de CO₂ y medios enriquecidos; la composición de la base del agar sangre influye en la capacidad de crecimiento¹³⁸. Para su detección en cultivos mixtos se han usado medios selectivos que contienen bacitracina, polimixina B, vancomicina y trimetoprim¹³⁹. Su desarrollo es inhibido por polianetol sulfonato sódico, anticoagulante utilizado en los medios para hemocultivos¹⁴⁰. Las especies de *Capnocytophaga* tienen crecimiento lento, las colonias se vuelven visibles después de 48 h de incubación y desarrollan una morfología característica después de este período. Las colonias de las especies de origen humano son amarillas, ocre o ligeramente rosadas y tienen proyecciones digitiformes marginales (movilidad por deslizamiento), que aparecen como una película que rodea el área central de la colonia, con las partes centrales con un aspecto moteado y húmedo (fig. 2B). Las colonias de origen canino son puntiformes después de 3-4 días de incubación, tras unos días más se vuelven circulares, lisas y convexas. Se desarrollan en agar sangre y chocolate, pero no en agar MacConkey. También se puede observar un buen crecimiento en agar de Thayer-Martin. *C. canimorsus* se ha aislado más frecuentemente de sangre. Sin embargo, puede no ser detectado por los sistemas de he-

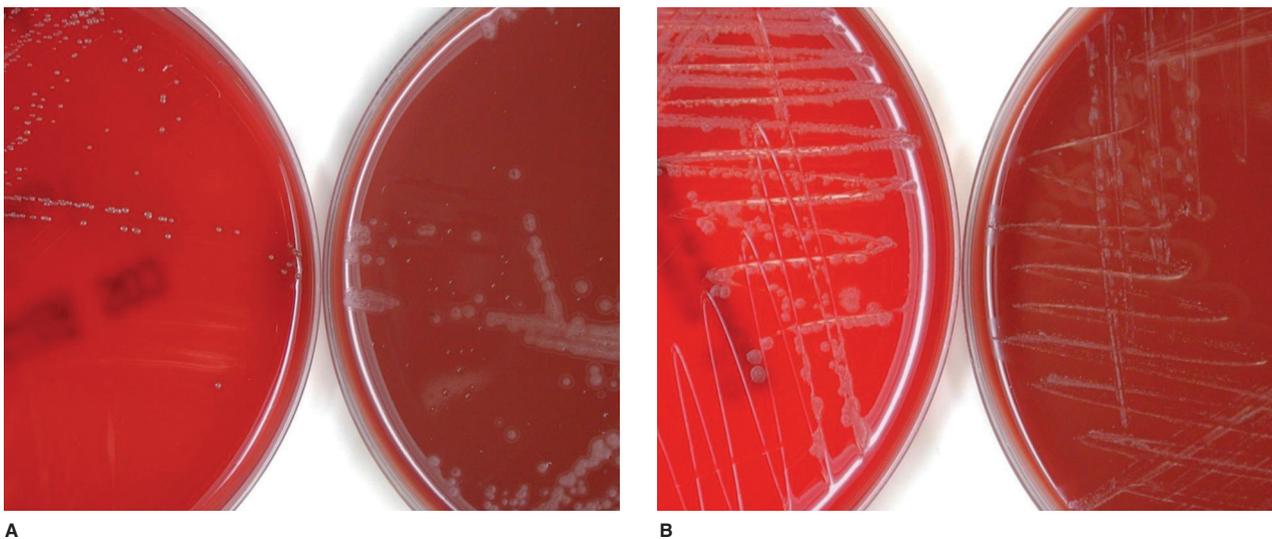


Figura 2. Morfología en agar sangre y agar chocolate de *Eikenella corrodens* (A) y *Capnocytophaga gingivalis* (B) tras 48 h de incubación a 35 °C en atmósfera aerobia enriquecida con 10% de CO₂.

mocultivos automatizados comúnmente utilizados; los clínicos deben informar al laboratorio sobre la presencia de los factores de riesgo para la infección por *C. canimorsus* para que se realicen subcultivos ciegos en medios enriquecidos¹³⁸.

En contraste con algunas especies de *Haemophilus*, las especies de *Pasteurella* son independientes de la hemina y el CO₂ y, por tanto, crecen en medios sin sangre. Las colonias son 1-2 mm de diámetro después de 24 h de crecimiento a 37 °C y son opacas y grisáceas. Las cepas encapsuladas tienden a ser mucoides. Se puede observar un ligero color verdoso por debajo de las colonias. Para el aislamiento de *Pasteurella* a partir de muestras contaminadas se han obtenido buenos resultados con medios selectivos que contienen clindamicina, y/o amikacina¹⁴¹.

Identificación fenotípica

La identificación fenotípica a nivel de especie es complicada y no siempre es posible, ya que requiere a menudo múltiples sustratos que normalmente no están disponibles en los laboratorios de rutina¹⁴² ni en los sistemas automatizados¹⁴³. En la tabla 2 se incluye una batería de pruebas bioquímicas que junto con la morfología microscópica y colonial nos orienta hacia una especie de este grupo, pero que requiere su confirmación por métodos moleculares o proteómicos. Hay que tener en cuenta que los medios utilizados para las pruebas bioquímicas deben ser ricos en peptonas, requieren un fuerte inóculo y, además, los medios utilizados normalmente para estudiar la formación de ácido a partir de carbohidratos pueden dar lugar a reacciones falsamente negativas¹⁴⁴. El documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para identificación rápida de bacterias y levadura¹⁴⁵ incluye 3 especies del grupo HACEK, *C. hominis*, *E. corrodens* y *K. kingae*. Aconseja que las claves de identificación del

documento solo se utilicen en caso de aislamiento de un sitio normalmente estéril.

El género *Haemophilus* presenta una reacción positiva en las pruebas de catalasa y oxidasa. Todas las especies, a excepción de *H. ducreyi*, requieren factor V, lo que les diferencia de *H. influenzae* y *H. haemolyticus*, que además requieren el factor X. La producción de betahemólisis en agar sangre de caballo o conejo permite diferenciar *H. parahaemolyticus* de *H. parainfluenzae*, que no la produce. Ambas especies (a excepción del biotipo V de *H. parainfluenzae*) son positivas al menos a una de las siguientes pruebas, indol, ODC y ureasa¹⁴⁶.

Aggregatibacter spp. tiene reacciones negativas para la producción de indol, ODC, ureasa. *A. aphrophilus* es catalasa y oxidasa negativas, aunque algunas cepas pueden dar una débil reacción de oxidasa. Produce ácido de sacarosa y lactosa. Las cepas anteriormente incluidas en *H. paraphrophilus* requieren factor V; estas cepas crecen bien en agar chocolate, pero no en agar sangre. *A. actinomycetemcomitans* presenta las pruebas de catalasa positiva, oxidasa negativa y no requiere ni factor V ni factor X. La reacción positiva de la catalasa, su incapacidad de producir ácido de la lactosa, sacarosa y la prueba de ONPG negativa la diferencia de *A. aphrophilus*. *A. segnis* requiere factor V, por lo que crece en agar chocolate, pero no en agar sangre. La prueba de la catalasa es variable. Tiene una producción retardada de ácido a partir de la glucosa y la sacarosa y no produce ácido de la lactosa¹⁴⁶.

C. hominis y *C. valvarum* son especies oxidasa positiva, catalasa negativa, ureasa negativa y que no reducen los nitratos ni hidrolizan la esculina. *C. hominis* es indol positivo, aunque produce pequeñas cantidades de indol, mientras que las cepas de *C. valvarum* aisladas de casos de endocarditis son fuertemente indol positivo, aunque las cepas de la microbiota oral son indol negativo¹⁴⁷. Producen ácido de la glucosa. *C. valvarum*, a diferencia de *C. hominis*, no produce ácido de la maltosa y sacarosa. Un bacilo gramnegativo aislado de un sitio

Tabla 2

Principales características fenotípicas de las especies del grupo HACEK, *Capnocytophaga* y *Pasteurella* que más frecuentemente producen patología en el ser humano

	Oxidasa	Catalasa	Requerido factor V	Ureasa	Reducción nitratos	Indol	ODC	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	+	+	+	v	+	v	v	+	+	+	-
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	+	-	v	+	-	-	+	-	v	-
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	-	-	v	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Aggregatibacter segnis</i>	-	v	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Cardiobacterium hominis</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	v	-
<i>Cardiobacterium valvarum</i>	+	-	-	-	-	v	-	+	-	-	-
<i>Eikenella corrodens</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Kingella kingae</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Kingella denitrificans</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	-	-	-	-	v	-	-	+	+	+	v
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	+	+	-	-	v	-	-	+	+	+	+
<i>Pasteurella multocida</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pasteurella dagmatis</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

ODC: ornitina descarboxilasa; v: reacción variable.

estéril, catalasa negativa, oxidasa positiva, indol positivo, no hemolítico y que no crece en agar MacConkey se debe considerar *C. hominis*. La característica tinción de Gram y la prueba de reducción de nitratos negativa confirman la identificación¹⁴⁸.

E. corrodens es oxidasa positiva y, generalmente, catalasa negativa. No requiere factor X ni factor V, aunque el factor X es necesario para el crecimiento aerobio, lo que puede llevar a confundirla con *Haemophilus* spp. cuando se intenta identificar con discos de los factores X y V, porque aparece crecimiento alrededor del factor X, pero no del factor V. Las pruebas de ODC y reducción de nitratos son positivas, pero las de indol y ureasa son negativas. Es asacarolítica. Entre los bacilos gramnegativos que no crecen en MacConkey, es la única bacteria catalasa negativa, oxidasa positiva e indol negativa que es ODC positiva¹⁴⁸.

K. kingae muestra una reacción negativa en las pruebas de catalasa, ureasa e indol, mientras que la prueba de oxidasa es positiva. Su betahemólisis la diferencia de otros miembros de este grupo de bacterias. El aislamiento de una bacteria con las anteriores características en un cultivo de una muestra articular o de sangre debe ser identificado como *K. kingae*¹⁴⁸. *K. kingae* produce ácido de la glucosa y de la maltosa, mientras que *K. denitrificans* solo lo produce de la glucosa, además esta última es capaz de crecer en agar de Thayer-Martin, lo que puede llevar a confundirla con *Neisseria gonorrhoeae*, sobre todo en muestras faríngeas y genitourinarias¹³⁷. Además, *K. denitrificans*, a diferencia de otras especies, reduce los nitratos a nitritos. La prueba de ODC es negativa.

Todas las especies de origen humano de *Capnocytophaga* son catalasa y oxidasa negativas y producen ácido a partir de la glucosa, maltosa y sacarosa. Las pruebas de indol, ureasa y ODC son negativas¹⁴⁹. En cambio, las especies de origen canino se diferencian de las especies humanas en las pruebas positivas de catalasa, oxidasa, ODC y ONPG⁹. Todas las especies producen perfiles de ácidos grasos celulares comunes que permiten la identificación del género¹⁵⁰.

Las principales características fenotípicas que comparten los miembros de *Pasteurella sensu stricto* son bacilos y cocobacilos gramnegativos, anaerobios facultativos e inmóviles. Los aislados indol positivos exhiben un olor parecido a ratonera. Son oxidasa, catalasa y fosfatasa alcalina positivas. Reducen los nitratos a nitritos y no hidrolizan la ONPG. Producen ácido de la glucosa, fructosa, manosa y sacarosa. Estas especies se pueden diferenciar por las reacciones de indol, ureasa, ODC y producción de ácido de los carbohidratos⁵.

Sistemas comerciales de identificación fenotípica

Entre los sistemas comerciales que incluyen en su base de datos bacterias del grupo HACEK, *Capnocytophaga* y *Pasteurella*, se encuentran sistemas manuales como Remel RapID NH (Remel, Lenexa, Kansas, EE. UU.), quadFERM+ kit (qF) (Analytab Products, Plainview, NY), BBL CRYSTAL™ Identification Systems *Neisseria*/*Haemophilus* (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), API NH (bioMérieux, La Balme-les-Grottes, Francia) y sistemas semi/automatizados como la tarjeta NH de VITEK2 (bioMérieux, Durham, NC), el panel NID de Phoenix NID (BD) y el panel HNID de MicroScan (Beckman Coulter/American MicroScan, Sacramento, Calif.).

El sistema VITEK2 NH identifica la mayoría de las especies del grupo HACEK y *Capnocytophaga* incluidas en su base de datos, así, en un estudio publicado, se identificaron correctamente el 64% de cepas estudiadas, y con baja discriminación un 14,7%. De 6 cepas de especies de *Pasteurella* spp. que no están incluidas en la base de datos, 4 se identificaron mal y 2 no se identificaron¹⁵¹. En otro estudio multicéntrico que incluyó 95 aislamientos clínicos del grupo HACEK y 5 de *Capnocytophaga*, se identificaron correctamente el 98% de los aislamientos¹⁵². Valenza et al identificaron correctamente 36 de 42 (85,7%) aislamientos clínicos del grupo HACEK¹⁴³.

El panel *Haemophilus-Neisseria* Identification (HNID) (Beckman Coulter) es un sistema de microdilución para la identificación en 4 h

de *Haemophilus* y *Neisseria* spp., *Branhamella* (*Moraxella*) *catarrhalis* y *Gardnerella vaginalis*. En una evaluación de este panel, aislados de *E. corrodens*, *Kingella* spp. y *C. hominis* (bacterias no incluidas en la base de datos) produjeron patrones únicos. Los autores sugieren la modificación de los criterios de interpretación de determinadas pruebas, la ampliación de la base de datos para incluir otras especies y la sugerencia de pruebas confirmatorias adicionales para mejorar la precisión y la utilidad de este panel¹⁵³.

Algunos sistemas (API 20NE y API NH) pueden identificar mal *C. valvarum*¹⁵⁴.

Especies de *Kingella* pueden ser confundidas en los sistemas automáticos con especies de *Neisseria*, pero pueden ser diferenciadas de estas por la morfología microscópica y colonial y por pruebas adicionales como la prueba de la catalasa¹⁴³. La identificación de *K. kingae* en los laboratorios clínicos también se puede realizar con un amplio rango de sistemas comerciales⁶, tales como quadFERM+kit¹⁵⁵, API NH, tarjeta NH de VITEK2^{143,156} y tarjeta NID de Phoenix (BD)¹⁵⁷. En una comparación entre el sistema BD Phoenix™ con Microscan Walkaway (Beckman Coulter), el sistema BD Phoenix™ identificó correctamente aislados de *K. kingae* que eran erróneamente identificados como *Moraxella* spp. por el sistema Microscan¹⁵⁷.

P. multocida se puede identificar mediante API 20E y API 20NE. En una publicación en la que se comparan ambos sistemas, API 20NE identificó correctamente el 95% de los aislamientos, mientras que API 20E solo adscribía a esta especie el 60% de los aislamientos¹⁵⁸. La tarjeta GN de VITEK2 identifica correctamente el 48,5% de 66 aislamientos de distintas especies de *Pasteurella*, mientras que la utilización de pruebas bioquímicas convencionales identificó el 94%¹⁵⁹. Debido a la similitud fenotípica de algunos taxones de *Pasteurella*, la identificación en sistemas automatizados puede ser insatisfactoria¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Identificación proteómica

Varios estudios han demostrado una buena identificación de los géneros *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella* (HACEK) por MALDI-TOF MS, así, Couturier et al estudiaron 103 especies de microorganismos del grupo HACEK y lograron un 93% de identificación del género y un 66% de identificación de la especie usando Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH, Alemania) con la base de datos MALDI Biotyper 2.0 (Bruker)¹⁶⁴. Powell et al en 2013¹⁵⁶ evaluaron la capacidad de VITEK MALDI-TOF MS (VITEK MS) (bioMérieux, Durham, NC) para identificar los miembros de los géneros *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Eikenella* y *Kingella* comparado con Remel RapID NH test y VITEK2 NH, usando como referencia la secuenciación del ARNr 16S. Para ello utilizaron 140 aislados y la base de datos VITEK MS SARAMIS de uso solo de investigación (RUO) versión 4.09. La identificación se consideró definitiva cuando la probabilidad proporcionada era superior al 70%. De los aislados estudiados, en 121 (86%) se identificó la especie y en 135 (96%) el género. Las identificaciones incorrectas incluyeron 11 *H. haemolyticus*, que fueron erróneamente identificados como *H. influenzae*, y 2 aislados de *A. aphrophilus*, que fueron identificados como *A. segnis* y *H. parainfluenzae*. Un estudio para evaluar la capacidad de MALDI-TOF en la identificación de bacterias y levaduras¹⁶⁵ analizó 51 aislamientos de bacterias del grupo HACEK y se obtuvo que el 98% de las cepas aisladas, que representaban 4 especies, eran correctamente identificadas por MALDI-TOF MS. Los aislamientos habían sido identificados previamente mediante VITEK II, API y pruebas bioquímicas, y se utilizó la secuenciación ARNr 16S para los resultados discrepantes.

MALDI-TOF MS ha sido utilizado en la identificación y caracterización de diferentes miembros del género *Haemophilus*¹⁶⁶. También en la identificación de aislados de *A. actinomycetemcomitans*¹⁴⁶. Durante un estudio centrado en la diferenciación entre *H. parahaemolyticus* y *H. paraphrohaemolyticus*, un taxón distinto de una especie no caracterizada de *Haemophilus* ha sido descrito y validado por

secuenciación del gen ARNr 16S como único. Esta única especie, ahora denominada *H. sputorum*, fue adicionalmente confirmada por MALDI-TOF MS usando la versión 2.0 del software de BioTyper gracias a la generación de un espectro único distinto del de las otras especies bacterianas analizadas¹⁶⁷.

Dos estudios han aplicado la técnica de MALDI-TOF utilizando la base de datos MALDI bioTyper en la identificación de *C. canimorsus* y de *C. cynodegmi*. Uno de ellos, utilizando 94 aislamientos de *C. canimorsus* y 10 de *C. cynodegmi* identificados por secuenciación de ARNr 16S, encontró un 17% de identificaciones correctas de especie *C. canimorsus* y un 100% de *C. cynodegmi*. Pero tras el establecimiento de una base de datos de referencia casera, que incorpora 51 espectros de *C. canimorsus* y 8 de *C. cynodegmi*, encontraron un 100% de identificaciones correctas en ambas especies. Lo que refleja la importancia de ir ampliando las bases de datos de MALDI-TOF¹⁶⁸. El otro estudio se realizó sobre 6 aislamientos de *C. canimorsus* y 20 de *C. cynodegmi*, también identificados mediante secuenciación de ARNr 16S y procedentes de sangre y heridas, y se comparó con VITEK2. VITEK2 identificó correctamente 10/20 aislamientos como *Capnocytophaga* spp., mientras que MALDI-TOF identificó correctamente 6/6 *C. canimorsus* y 13/14 *C. cynodegmi*¹⁶⁹. Varios casos clínicos publicados también han presentado la capacidad de MALDI-TOF para identificar las especies de *Capnocytophaga* de origen humano^{105,170}.

Un estudio ha valorado la eficacia de los métodos bioquímicos convencionales, el sistema VITEK2 y las 2 plataformas MALDI-TOF, VITEK MS y Bruker BioTyper MS para identificar *Pasteurella* spp. Se incluyeron 65 aislamientos (*P. multocida* [n = 41], *P. canis* [n = 17], *P. dagmatis* [n = 2], *P. stomatis* [n = 4] y *P. pneumotropica* [n = 1]) procedentes de 64 muestras de heridas, 1 de sangre y una cepa de referencia de *P. multocida*. Las pruebas bioquímicas convencionales identificaron el 94% de ellas, VITEK2 el 48,5% y ambas plataformas de MALDI-TOF el 89%. Se utilizó como método de referencia la secuenciación de *sodA*¹⁵⁹. Un caso publicado de meningitis por *P. multocida* ha presentado que MALDI-TOF puede ser utilizado como una técnica para identificar la relación clonal entre aislamientos de animales y de hombres¹⁷¹.

Detección mediante biología molecular

Los sistemas automatizados pueden presentar dificultades en la identificación de estas especies^{40,143,156}. A la vista de la similitud fenotípica de las especies y el número de sustratos requeridos, los métodos proteómicos y los moleculares (secuenciación de ARNr 16S, *sodA* o gen *rpoB*) parecen más adecuados para la identificación de especie de *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Capnocytophaga*, *Pasteurella* y determinadas especies de *Haemophilus*^{40,172-174}. La técnica de secuenciación del ARNr 16S se basa en la extracción del ADN de muestras clínicas, seguido de incubación con *primers* universales que alinean con la porción conservada del gen ARNr 16S, resultando en la amplificación de la secuencia específica de las especies implicadas. Los productos de amplificación son entonces secuenciados y los resultados son emparejados con los datos depositados en GenBank u otra base de datos genómica extensa, o los productos son hibridados con sondas específicas del organismo¹⁷³.

También se han descrito ensayos de PCR en tiempo real para la cuantificación de bacterias en la placa subgingival^{27,175}, saliva^{176,177} y otras muestras¹⁷⁸. Entre los patógenos que se cuantifican siempre se incluyen *A. actinomycetemcomitans* y en algunos casos *E. corrodens*¹⁷⁶.

Como con otros agentes de endocarditis bacteriana, la PCR de rango amplio se ha utilizado con éxito para la detección de *C. hominis* y *C. valvarum* directamente de muestras clínicas^{51,179,180}.

Un número importante de infecciones osteoarticulares pediátricas permanece bacteriológicamente sin confirmar y, en otros casos, el aislamiento, la identificación completa del microorganismo responsable y las pruebas de sensibilidad a los agentes antimicrobianos requieren un mínimo de 2 o 3 días. En los últimos años, el uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos ha permitido la identi-

ficación de los agentes etiológicos de las infecciones articulares y óseas en menos de 24 h^{181,182}. Uno de los enfoques es la secuenciación de la porción conservada del gen ARNr 16S^{183,184}. Verdier et al¹⁸⁵, usando medios sólidos y frascos de hemocultivos, confirmaron el diagnóstico en 64 de 171 (37,4%) muestras de exudados de artritis y osteomielitis, de los cuales en 9 creció *K. kingae*. Siguiendo el método de amplificación y secuenciación ARNr 16S, de las 107 muestras de cultivo negativas se encontraron 15 positivas, todas para *K. kingae*. Esta metodología también ha permitido identificar *K. kingae* en un caso de pericarditis⁷².

Alternativamente, con las muestras clínicas se puede realizar un procedimiento de PCR empleando *primers* dirigidos selectivamente a las bacterias más probablemente implicadas. En los últimos años, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que utilizan secuencias de ADN específicas de *K. kingae*, tales como *cpn60* (que codifica una proteína la chaperonina 60)¹⁸⁶ o los genes que codifican la citotoxina RTX^{65,66}, se han introducido en la práctica clínica con el objetivo de mejorar su detección. Una PCR de amplio espectro también ha permitido detectar secuencias específicas de *K. kingae* en muestras osteoarticulares con cultivo negativo¹⁸⁷. Los resultados obtenidos mejoran los de la PCR universal ARNr 16S. A causa del papel predominante de *K. kingae* en niños menores de 4 años con infección ósea o articular, los autores recomiendan el uso de una PCR con *primers* específicos de *K. kingae* como técnica de primera línea en este segmento de población, reservando el uso de la de amplio espectro para los casos en que la PCR específica ha sido negativa⁶.

Se ha desarrollado una PCR para *A. actinomycetemcomitans*¹⁸⁸, y en unos pocos casos, la PCR de amplio espectro ha llevado al diagnóstico de la infección por *A. actinomycetemcomitans* a partir de válvulas cardíacas o de émbolos^{32,180}.

También se ha utilizado una PCR para la detección de *E. corrodens* en placas subgingivales¹⁸⁸.

La aplicación de las técnicas moleculares ha dado lugar a un aumento de la identificación de *Capnocytophaga* spp. La secuenciación del gen ARNr 16S es en este momento la herramienta diagnóstica más adecuada¹⁴⁹. Asimismo, la técnica de PCR ha permitido la detección de *Capnocytophaga*¹⁸⁹ y de *Pasteurella*¹⁹⁰.

Diagnóstico serológico

No es de utilidad en el diagnóstico de la infección por este grupo de bacterias.

Determinación de la sensibilidad a los agentes antimicrobianos

Las pruebas de sensibilidad a los agentes antimicrobianos de las bacterias de crecimiento lento o infrecuentemente aisladas, incluyendo el grupo HACEK y *Pasteurella*, ha sido objeto de una guía del CLSI¹⁹¹. La mayor parte de las bacterias de crecimiento lento no crece satisfactoriamente en los sistemas estándar para el estudio de la sensibilidad que usan medios sin suplementar, por ello se han incluido modificaciones que generalmente introducen el uso de medios de cultivo con nutrientes adicionados, a veces un tiempo de incubación prolongado y/o la incubación en una atmósfera con los valores incrementados de CO₂^{191,192}. Para las pruebas de sensibilidad a los agentes antimicrobianos de los miembros del grupo HACEK se puede utilizar la microdilución en caldo Mueller-Hinton ajustado en cationes con 2,5-5% de sangre lisada de caballo. Algunos aislados pueden requerir 48 h de incubación para obtener un crecimiento adecuado. Algunos aislados pueden no crecer satisfactoriamente en caldo de Mueller-Hinton con sangre lisada de caballo¹⁹². Para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos mediante la técnica de disco difusión de *Haemophilus* se recomienda el agar *Haemophilus test medium* (HTM) con incubación de 16-18 h a 35 °C en atmósfera aerobia con el 5-7% de CO₂, y para el método de dilución en caldo se recomienda caldo HTM durante 20-24 h de incubación en atmósfera aerobia¹⁹³.

Los métodos de microdilución en caldo y difusión en disco se han descrito por la CLSI para las pruebas de sensibilidad de *Pasteurella* spp. Los medios recomendados para microdilución en caldo es caldo de Mueller-Hinton ajustado en cationes con sangre lisada de caballo y para difusión en disco, agar de Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero. En ambos casos se recomienda una atmósfera aerobia, 18-24 h de incubación. Los antibióticos que se recomienda incluir son amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrólidos, penicilinas, tetraciclinas y cotrimoxazol¹⁹².

La realización de las pruebas de sensibilidad está justificada en aislados de sitios normalmente estériles, así como en los de origen respiratorio, especialmente en pacientes inmunocomprometidos¹⁹². Asimismo se recomienda en estos aislados la realización de una prueba de detección de betalactamasa, como la prueba de la cefalosporina

cromogénica¹⁹². Las pruebas de sensibilidad de aislados de heridas de mordeduras no son necesarias, ya que las infecciones de heridas por mordeduras son generalmente tratadas de forma empírica con agentes (p. ej., amoxicilina-ácido clavulánico) que cubren la variedad de microorganismos más probablemente implicados en la infección¹⁹².

El European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recomienda la utilización de agar MH-F MH suplementado con 5% de sangre de caballo defibrinada con 20 mg/l de β -NAD, para las pruebas de sensibilidad en disco para *H. influenzae*, *P. multocida* y *K. kingae*. También recomienda caldo MH-F, con cationes ajustados y suplementado con un 5% sangre de caballo lisada y 20 mg/l de β -NAD. En ambos casos solo incluye los valores de corte de *H. influenzae*, *Pasteurella* spp. y *K. kingae*. Los antibióticos para los que existen puntos de corte en EUCAST para *Pasteurella* son bencilpenicilina, amoxi-

Tabla 3
Tratamiento antimicrobiano de las infecciones producidas por las bacterias del grupo HACEK, *Pasteurella* y *Capnocytophaga*

Especie	Tratamiento de elección	Tratamiento alternativo	Resistencia
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Ampicilina +/- aminoglucósido	Cefalosporinas 3. ^a	Algunas cepas son resistentes a las cefalosporinas 3. ^a
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>		Carbapenem	
<i>Haemophilus pittmaniae</i>			
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Amoxicilina-clavulánico +/- aminoglucósido	Cefalosporina 3. ^a	<i>A. actinomycetemcomitans</i> es resistente a penicilina, clindamicina, y puede ser resistente a vancomicina y eritromicina
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>		Cotrimoxazol	
<i>Aggregatibacter segnis</i>		Doxiciclina	
		Ciprofloxacino	
		<i>A. actinomycetemcomitans</i> es sensible a metronidazol	
<i>Cardiobacterium hominis</i>	Cefalosporinas 3. ^a +/- aminoglucósido	Piperacilina-tazobactam	
<i>Cardiobacterium valvarum</i>		Carbapenem	
<i>Eikenella corrodens</i>	Ceftriaxona	Doxiciclina	Metronidazol
	Amoxicilina-clavulánico	Levofloxacino	Cloxacilina
		Meropenem	Cefalosporinas 1. ^a y 2. ^a
		Aminoglucósidos	Clindamicina
			Macrólidos
<i>Kingella kingae</i>	Penicilina G	Quinolonas	Algunas cepas producen betalactamasas
<i>Kingella denitrificans</i>	Cefalosporinas 3. ^a +/- aminoglucósido	Carbapenems	
<i>Kingella oralis</i>		Tetraciclinas	
<i>Kingella potus</i>		Cotrimoxazol	
<i>Capnocytophaga</i> spp.	Amoxicilina-clavulánico	Clindamicina	Aminoglucósidos
	Piperacilina-tazobactam	Linezolid	Colistina
	Carbapenem	Cefalosporina 3. ^a	
<i>Pasteurella multocida</i>	Amoxicilina-clavulánico	Doxiciclina	<i>P. multocida</i> es resistente a cloxacilina, cefalosporinas 1. ^a , clindamicina, eritromicina, aminoglucósidos
<i>Pasteurella dagmatis</i>	Penicilina	Cefalosporina 3. ^a	
<i>Pasteurella gallinarum</i>		Fluoroquinolona	
		Carbapenem	
		Cotrimoxazol	

cilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, ciprofloxacino, levofloxacino, ácido nalidíxico, doxiciclina, tetraciclina y cotrimoxazol, y para *K. kingae*, además de estos, se incluyen ceftriaxona, cefuroxima intravenosa, meropenem, azitromicina, claritromicina, eritromicina, clindamicina y rifampicina¹⁹⁴.

Sensibilidad a los agentes antimicrobianos

Los datos sobre la sensibilidad a los agentes antimicrobianos de las bacterias del grupo HACEK y otras bacterias de crecimiento lento son limitados, principalmente debido a que su aislamiento es infrecuente y no son fáciles de cultivar. Además, las pruebas de sensibilidad a los agentes antimicrobianos son complejas y difíciles de implementar en los laboratorios clínicos, por lo que en muchos casos se recurre a métodos no estandarizados. De los datos disponibles se observa que las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas son ampliamente activas frente a las bacterias del grupo HACEK. Estas bacterias también son generalmente sensibles a penicilina y ampicilina¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

La producción de betalactamasa entre los miembros del grupo HACEK está bien documentada, y los aislados productores de betalactamasa son resistentes a ampicilina¹⁹². Así, aislados ocasionales de *C. hominis*, *E. corrodens*, *Kingella* spp. y *Pasteurella* spp. producen betalactamasa^{195,198-200}, sin embargo no se ha demostrado en *A. actinomycetemcomitans*^{201,202}.

Las especies de *Haemophilus* son habitualmente sensibles a betalactámicos (tabla 3), aunque se ha descrito un número considerable de cepas de *Haemophilus* spp. productoras de betalactamasa. Las cepas productoras de betalactamasa son sensibles a cefalosporinas de 2.^a y 3.^a generaciones, carbapenems y a la asociación de betalactámicos con inhibidores de betalactamasa como amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam. También algunos aislados de *Haemophilus* y *E. corrodens* pueden ser resistentes a ampicilina debido a otros mecanismos distintos a la producción de betalactamasa^{192,195}. La resistencia a ampicilina de las cepas de *Haemophilus* no productoras de betalactamasa se debe, generalmente, a modificaciones de las proteínas de unión a penicilina²⁰³. Estas cepas también tienen las concentraciones mínimas inhibitorias más elevadas a las cefalosporinas de 2.^a y 3.^a generaciones²⁰⁴. Otros antibióticos activos frente a *Haemophilus* son los macrólidos, las fluorquinolonas, las tetraciclinas y el cotrimoxazol. De estos antibióticos, cotrimoxazol es el que tiene mayor tasa de resistencia en *H. parainfluenzae*, en algunas zonas con tasas cercanas al 50%²⁰⁵.

A. actinomycetemcomitans y *A. aphrophilus* son sensibles a cefalosporinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos. *A. actinomycetemcomitans* es resistente a penicilina, clindamicina, y puede ser resistente a vancomicina y eritromicina^{197,206}. La resistencia a ampicilina no es infrecuente^{207,208}, pero la amoxicilina combinada con un inhibidor de betalactamasa es efectiva¹⁹⁷. El tratamiento de las infecciones por estos microorganismos suele hacerse con amoxicilina-clavulánico acompañado de un aminoglucósido en los casos de endocarditis o bacteriemia (tabla 3).

C. hominis y *C. valvarum* son habitualmente sensibles a betalactámicos, incluyendo penicilina, fluorquinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas (tabla 3). La susceptibilidad a macrólidos y aminoglucósidos es variable^{146,197,209}. La producción de betalactamasa es rara, y sus efectos pueden ser neutralizados por el ácido clavulánico^{192,210}. El tratamiento recomendado para la endocarditis por *C. hominis* es ceftriaxona o ciprofloxacino durante al menos 4 semanas en la endocarditis sobre válvula nativa y 6 semanas para los casos de endocarditis sobre válvula protésica²¹¹. Los pacientes con endocarditis sobre válvula nativa se pueden tratar solo con antibioterapia, aunque en algunos casos puede ser necesaria la cirugía para resolver la infección.

E. corrodens es generalmente sensible a ampicilina, cefalosporinas de 2.^a y 3.^a generaciones, carbapenems, doxiciclina, azitromicina y fluoroquinolonas y resistente a cloxacilina, aminoglucósidos, eritromicina, clindamicina, metronidazol y vancomicina (tabla 3). Presenta

una sensibilidad variable a cefalosporinas de 1.^a generación y penicilina^{53,197,212}. Se han informado cepas productoras de betalactamasa, pero la enzima era inhibida por inhibidores de betalactamasa. Las betalactamasas pueden ser plasmídicas o cromosómicas^{192,213}.

K. kingae y *K. denitrificans* son generalmente sensibles a penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas y cotrimoxazol. Algunos aislamientos son resistentes a eritromicina y la mayoría, a clindamicina y vancomicina^{130,197} (tabla 3). Los aislamientos publicados resistentes a ampicilina son sensibles a la combinación de esta con un inhibidor de betalactamasa^{76,214}.

Capnocytophaga spp. es normalmente sensible a penicilinas con inhibidores de betalactamasa, cefalosporinas de amplio espectro, carbapenems, lincosamidas, macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas, pero presenta resistencia a colistina y a aminoglucósidos²¹⁵. Se han comunicado aislamientos multiresistentes a los antibióticos¹¹¹.

Pasteurella spp. es generalmente sensible a penicilina y ampicilina, sin embargo se han publicado aislados de *Pasteurella* spp. de origen respiratorio resistentes a penicilina por la producción de betalactamasa sensible a inhibidores^{198,216-219}. Generalmente, también es sensible a amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas de amplio espectro, tetraciclinas, fluoroquinolonas y cotrimoxazol, pero a menudo son resistentes a cefalosporinas de 1.^a generación, clindamicina, macrólidos, cloxacilina y aminoglucósidos^{216,220} (tabla 3). Para los aislados de *Pasteurella* spp. de heridas de mordeduras, las pruebas de sensibilidad no son necesarias, ya que unas variedades de microorganismos están con frecuencia presentes en estas muestras. La terapia empírica dirigida hacia estos microorganismos es generalmente efectiva también para *P. multocida*¹⁹². Todas las especies son normalmente sensibles a penicilinas, cefalosporinas y tetraciclinas⁵.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

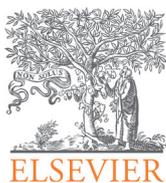
- Weinstein MP. Emerging data indicating that extended incubation of blood cultures has little clinical value. *Clin Infect Dis.* 2005;41:1681-2.
- Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Inf Dis.* 2005;41:1677-80.
- Petti CA, Bhalley HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller LB, et al. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol.* 2006;44:257-9.
- Norskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus*, and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov., and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2135-56.
- Janda WM. Update on family Pasteurellaceae and the status of genus *Pasteurella* and genus *Actinobacillus*. *Clin Microbiol Newsl.* 2011;33:135-44.
- Yagupsky P. *Kingella kingae*: Carriage, transmission, and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:54-79.
- Slotnick IJ, Dougherty M. Further characterization of an unclassified group of bacteria causing endocarditis in man: *Cardiobacterium hominis* gen. et sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1964;30:261-72.
- Han XY, Meltzer MC, Woods JT, Fainstein V. Endocarditis with ruptured cerebral aneurysm caused by *Cardiobacterium valvarum* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1590-5.
- Frandsen EV, Poulsen K, Könönen E, Kilian M. Diversity of *Capnocytophaga* species in children and description of *Capnocytophaga leadbetteri* sp. nov. and *Capnocytophaga* genospecies AHN8471. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:324-36.
- Brenner DJ, Hollis DG, Fanning GR, Weaver RE. *Capnocytophaga canimorsus* sp. nov. (formerly CDC group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *J Clin Microbiol.* 1989;27:231-5.
- Ho HH, Cheung CW, Yeung CK. Septic peripheral embolization from *Haemophilus parainfluenzae* endocarditis. *Eur Heart J.* 2006;27:100.
- Nwaohiri N, Urban C, Gluck J, Ahluwalia M, Wehbeh W. Tricuspid valve endocarditis caused by *Haemophilus parainfluenzae*: a case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64:216-9.
- Cardines R, Giufrè M, Ciofi Degli Atti ML, Accogli M, Mastrantonio P, Cerquetti M. *Haemophilus parainfluenzae* meningitis in an adult with acute otitis media. *New Microbiol.* 2009;32:213-5.

14. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:336-63.
15. Ungkanont K, Yellon RF, Weissman JL, Casselbrant ML, González-Valdepeña H, Bluestone CD. Head and neck space infections in infants and children. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;112:375-82.
16. Rele M, Giles M, Daley AJ. Invasive *Haemophilus parainfluenzae* maternal-infant infections: an Australian perspective and case report. *Aust NZ J Obstet Gynecol.* 2006;46:254-60.
17. Frankard J, Rodriguez-Villalobos H, Struelens MJ, Jacobs F. *Haemophilus parainfluenzae*: an underdiagnosed pathogen of biliary tract infections? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:46-8.
18. Patel SB, Hashmi ZA, Marx RJ. A retroperitoneal abscess caused by *Haemophilus parainfluenzae* after endoscopic retrograde cholangiopancreatography and open cholecystectomy with a common bile duct exploration: a case report. *J Med Case Rep.* 2010;4:170-2.
19. Huang ST, Lee HC, Lee NY, Liu KH, Ko WC. Clinical characteristics of invasive *Haemophilus aphrophilus* infections. *J Microbiol. Immunol Infect.* 2005;38:271-6.
20. Jung GW, Parkins MD, Church D. Pyogenic ventriculitis complicating *Aggregatibacter aphrophilus* infective endocarditis: a case report and literature review. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2009;20:e107-9.
21. Ariyaratnam S, Gajendragadkar PR, Dickinson RJ, Roberts P, Harris K, Carmichael A, et al. Liver and brain abscess caused by *Aggregatibacter paraphrophilus* in association with a large patent foramen ovale: a case report. *J Med Case Rep.* 2010;4:69.
22. O'Grady G, Barnett T, Thomson N. Intraparotid lymphadenitis caused by *Haemophilus aphrophilus*. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;136 Suppl 4:S54-5.
23. Colson P, LaScola B, Champsaur P. Vertebral infections caused by *Haemophilus aphrophilus*: case report and review. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:107-13.
24. Kiddy K, Webberley J. *Haemophilus aphrophilus* as a cause of chronic suppurative pulmonary infection and intra-abdominal abscesses. *J Infect.* 1987;15:161-3.
25. Pasqualini L, Mencacci A, Scarponi AM, Leli C, Fabbriani G, Callarelli L, et al. Cervical spondylodiscitis with spinal epidural abscess caused by *Aggregatibacter aphrophilus*. *J Med Microbiol.* 2008;57:652-5.
26. Wu D, Giri B. *Haemophilus paraphrophilus* peritonitis followed by tuberculous peritonitis and Pott's disease. *Am J Med Sci.* 2010;340:511-3.
27. Chen C, Wang T, Chen W. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Mol Oral Microbiol.* 2010;25:207-14.
28. Novak MJ, Dawson DR 3rd, Magnusson I, Karpinia K, Polson A, Polson A, et al. Combining host modulation and topical antimicrobial therapy in the management of moderate to severe periodontitis: a randomized multicenter trial. *J Periodontol.* 2008;79:33-41.
29. Renvert S, Lessem J, Dahlén G, Lindahl C, Svensson M. Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006;33:362-9.
30. Wang CY, Wang HC, Li JM, Wang JY, Yang KC, Ho YK, et al. Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010;43:491-7.
31. Potron A, Mainardi JL, Podglajen I, Meunier F, Sanson-le Pors MJ, Berçot B. Recurrent infective endocarditis due to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: reinfection or relapse. *J Med Microbiol.* 2010;59:1524-6.
32. Westling K, Vondracek M. *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (HACEK) identified by PCR/16S rRNA sequence analysis from the heart valve in a patient with blood culture negative endocarditis. *Scand J Infect Dis.* 2008;40:981-96.
33. Antony B, Thomas S, Chandrashekar SC, Kumar MS, Kumar V. Osteomyelitis of the mandible due to *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009;52:115-6.
34. Hagiwara S, Fujimaru T, Ogino A, Takano T, Sekijima T, Kagimoto S, et al. Lung abscess caused by infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Pediatr Int.* 2009;51:748-51.
35. Stepanović S, Tosić T, Savić B, Jovanović M, K'ouas G, Carlier JP. Brain abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *APMIS.* 2005;113:225-8.
36. Binder MI, Chua J, Kaiser PK, Mehta N, Isada CM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endogenous endophthalmitis: report of two cases and review of the literature. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:133-6.
37. Nashi M, Venkatachalam AK, Unsworth PF, Muddu BN. Diskitis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Orthopedics.* 1998;21:714-6.
38. Shenoy S, Kavitha R, Laxmi V, Pai SM, Prabhu G. Septic arthritis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Ind J Pediatr.* 1996;63:569-70.
39. Carson HJ, Rezmer S, Belli J. *Haemophilus segnis* cholecystitis: a case report and literature review. *J Infect.* 1997;35:85-6.
40. Lau SK, Woo PC, Mok MY, Teng JL, Tam VK, Chan KK, et al. Characterization of *Haemophilus segnis*, an important cause of bacteremia, by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2004;42:877-80.
41. Somers CJ, Millar BC, Xu J, Moore DP, Moran AM, Maloney C, et al. *Haemophilus segnis*: a rare cause of endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:1048-50.
42. Chentanez T, Khawcharoenporn T, Chokrungranon N, Joyner J. *Cardiobacterium hominis* endocarditis presenting as acute embolic stroke: a case report and review of the literature. *Heart Lung.* 2010;40:262-9.
43. Lena TS, De Meulemeester C. A case of infective endocarditis caused by *Cardiobacterium hominis* in a patient with HLAB27 aortitis. *Can J Neurol Sci.* 2009;36:385-7.
44. Currie PF, Codispoti M, Mankad PS, Godman MJ. Late aortic homograft valve endocarditis caused by *Cardiobacterium hominis*: a case report and review of the literature. *Heart.* 2000;83:579-81.
45. Shivaprakasha S, Radhakrishnan K, Kamath P, Karim P. Late prosthetic valve endocarditis due to *Cardiobacterium hominis*, an unusual complication. *Ind J Med Microbiol.* 2007;25:64-6.
46. Nurnberger M, Treadwell T, Lin B, Weintraub A. Pacemaker lead infection and vertebral osteomyelitis presumed due to *Cardiobacterium hominis*. *Clin Infect Dis.* 1998;27:890-1.
47. Bhan I, Chen EJ, Bazari H. Isolation of *Cardiobacterium hominis* from the peritoneal fluid of a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Scand J Infect Dis.* 2006;38:301-3.
48. Push T, Fisher MA, Gander RM. *Cardiobacterium valvarum*, an emerging new HACEK organism, as the causative agent of infective endocarditis: case report and review of the literature. *Clin Microbiol Newsl.* 2015;37:127-32.
49. Chen M, Kemp M, Bruun NE, Bangsberg JM, Højlyng N, Hesselbjerg A, et al. *Cardiobacterium valvarum* infective endocarditis and phenotypic/molecular characterization of 11 *Cardiobacterium* species strains. *J Med Microbiol.* 2011;60:522-8.
50. Hoffman MJ, Macrie BD, Taiwo BO, Qi C. Prosthetic valve/conduit infection caused by *Cardiobacterium valvarum*. *Infection.* 2010;38:245-6.
51. Vanerková M, Zaloudíková B, Nemcová E, Juránková J, Pol J, Cerný J, et al. Detection of *Cardiobacterium valvarum* in a patient with aortic valve infective endocarditis by broad-range PCR. *J Med Microbiol.* 2010;59:231-4.
52. Rocas IN, Siqueira JF. Culture-independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2006;32:509-12.
53. Uda ta T, Hiraki N, Shiomori T, Miyamoto H, Fujimura T, Inaba T, et al. *Eikenella corrodens* in head and neck infections. *J Infect.* 2007;54:343-8.
54. Hoyle SL, Antony S. *Eikenella corrodens*: an unusual cause of severe parapneumonic infection and empyema in immunocompetent patients. *J Natl Med Assoc.* 2001;93:224-9.
55. Asensi V, Alvarez M, Carton JA, Lago M, Maradona JA, Asensi JM, et al. *Eikenella corrodens* brain abscess after repeated periodontal manipulations cured with imipenem and neurosurgery. *J Infect.* 2002;30:240-2.
56. Mahapatra A, Mishra S, Pattnaik D, Pattnaik K. Bacterial endocarditis due to *Eikenella corrodens*: a case report. *Indian J Med Microbiol.* 2003;21:135-6.
57. Gonzalez MH, Garst J, Nourbakhsh P, Pulvirenti J, Hall RF Jr. Abscesses of the upper extremity from drug abuse by injection. *J Hand Surg Am.* 1993;18:868-70.
58. Arnon R, Ruzal-Shapiro C, Salen E, DeFelice A, Kazlow P. *Eikenella corrodens*: a rare pathogen in a polymicrobial hepatic abscess in an adolescent. *Clin. Pediatr.* 1999;38:429-32.
59. Garnier F, Masson G, Bedu A, Masson P, Decroisette E, Guignon V, et al. Maternal-fetal infections due to *Eikenella corrodens*. *J Med Microbiol.* 2009;58:273-5.
60. Yagupsky P, Dagan R, Prajrod F, Merimes M. Respiratory carriage of *Kingella kingae* among healthy children. *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14:673-8.
61. Kiang KM, Ogunmodede F, Juni BA, Boxrud DJ, Glennen A, Bartkus JM, et al. Outbreak of osteomyelitis/septic arthritis caused by *Kingella kingae* among child care center attendees. *Pediatrics.* 2005;116:e206-13.
62. Yagupsky P, Erlich Y, Ariela S, Trefler R, Porat N. Outbreak of *Kingella kingae* skeletal system infections in children in daycare. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:526-32.
63. Dubnov-Raz G, Ephros M, Garty BZ, Schlesinger Y, Maayan-Metzger A, Hasson J, et al. Invasive pediatric *Kingella kingae* infections: a nationwide collaborative study. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:639-43.
64. Yagupsky P, Porsch E, St. Geme JW. *Kingella kingae*: an emerging pathogen in young children. *Pediatrics.* 2011;127:557-65.
65. Ceroni D, Cherkaoui A, Ferey S, Kaelin A, Schrenzel J. *Kingella kingae* osteoarticular infections in young children: clinical features and contribution of a new specific real-time PCR assay to the diagnosis. *J Pediatr Orthop.* 2010;30:301-4.
66. Cherkaoui A, Ceroni D, Emonet S, Lefevre Y, Schrenzel J. Molecular diagnosis of *Kingella kingae* osteoarticular infections by specific real-time PCR assay. *J Med Microbiol.* 2009;58:65-8.
67. Mounile K, Merckx J, Glorion C, Pouliquen JC, Berche P, Ferroni A. Bacterial aetiology of acute osteoarticular infections in children. *Acta Paediatr.* 2005;94:419-22.
68. Elyès B, Mehdi G, Kamel BH, Hela Z, Imen BS. *Kingella kingae* septic arthritis in an adult. *Joint Bone Spine.* 2006;73:472-3.
69. Seña AC, Seed P, Nicholson B, Joyce M, Cunningham CK. *Kingella kingae* endocarditis and a cluster investigation among daycare attendees. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:86-8.
70. Rotsein A, Konstantinov IE, Penny DJ. *Kingella* infective endocarditis resulting in a perforated aortic root abscess and fistulous connection between the sinus of Valsalva and the left atrium in a child. *Cardiol Young.* 2010;20:332-3.
71. Korach A, Olshstein-Pops K, Schwartz D, Moses A. *Kingella kingae* prosthetic valve endocarditis complicated by a paravalvular abscess. *Isr Med Assoc J.* 2009;11:251-3.
72. Matta M, Wermert D, Podglajen I, Sanchez O, Buu-Hoi A, Gutmann L, et al. Molecular diagnosis of *Kingella kingae* pericarditis by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3133-4.
73. Ramana KV, Mohanty SK. An adult case of urinary tract infection with *Kingella kingae*: a case report. *J Med Case Rep.* 2009;3:7236.
74. Kim YH, Panday V, Reilly C. Isolation of *Kingella denitrificans* from a corneal ulcer. *Cornea.* 2010;30:472-3.
75. Maccato M, McLean W, Riddle G, Faro S. Isolation of *Kingella denitrificans* from amniotic fluid in a woman with chorioamnionitis: a case report. *J Reprod Med.* 1991;36:685-7.
76. Minamoto GY, Sordillo EM. *Kingella denitrificans* as a cause of granulomatous disease in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1992;15:1052-3.
77. Molina R, Baró T, Torné J, Miralles R, Gutiérrez J, Solsona JF, et al. Empyema caused by *Kingella denitrificans* and *Peptostreptococcus* spp. in a patient with bronchogenic carcinoma. *Eur Respir J.* 1988;1:870-1.

78. Dewhurst FE, Chen CK, Paster BJ, Zambon JJ. Phylogeny of species in the family Neisseriaceae isolated from human dental plaque and description of *Kingella orale* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1993;43:490-9.
79. Lawson PA, Malnick H, Collins MD, Shah JJ, Chattaway MA, Bendall R, et al. Description of *Kingella potus* sp. nov., an organism isolated from a wound caused by an animal bite. J Clin Microbiol. 2005;43:3526-9.
80. Baquero F, Fernandez J, Drona F, Erice A, Perez de Oteiza J, Reguera JA, et al. Capnophilic and anaerobic bacteremia in neutropenic patients: an oral source. Rev Infect Dis. 1990;12 Suppl 2:S157-60.
81. Viudes A, Orero A, Larrea L, Pérez Bellés C, Pérez de León A, Pérez Silvert M, et al. Bacteremia caused by *Capnocytophaga ochracea*: apropos of 2 cases. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1997;15:338-9.
82. Bonatti H, Rossboth DW, Nachbaur D, Fille M, Aspöck C, Hend I, et al. A series of infections due to *Capnocytophaga* spp in immunosuppressed and immunocompetent patients. Clin Microbiol Infect. 2003;9:380-7.
83. Marco F, Lozano M, Almela M, Bladé J, Jimenez de Anta MT. Sepsis caused by *Capnocytophaga ochracea* in a patient with acute leukemia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1989;7:394-6.
84. Kim JA, Hong SK, Kim EC. *Capnocytophaga sputigena* bacteremia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. Ann Lab Med. 2014;34:325-7.
85. Martino R, Rámila E, Capdevila JA, Planes A, Rovira M, Ortega MD, et al. Bacteremia caused by *Capnocytophaga* species in patients with neutropenia and cancer: results of a multicenter study. J Clin Infect Dis. 2001;33:E20-2.
86. Rummens JL, Verfaillie C, Louwagie A, Boelaert J, Van Landuyt HW. *Capnocytophaga* infection: a risk in the immunocompromised host. Acta Clin Belg. 1984;39:109-13.
87. Geisler WM, Malhotra U, Stamm WE. Pneumonia and sepsis due to fluoroquinolone-resistant *Capnocytophaga gingivalis* after autologous stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2001;28:1171-3.
88. Bilgrami S, Bergstrom SK, Peterson DE, Hill DR, Dainiak N, Quinn JJ, et al. *Capnocytophaga* bacteremia in a patient with Hodgkin's disease following bone marrow transplantation: case report and review. Clin Infect Dis. 1992;14:1045-9.
89. Pokroy-Shapira E, Shiber S, Molad Y. *Capnocytophaga* bacteraemia following rituximab treatment. BMJ Case Reports. 2012;13:2012.
90. Heidemann DG, Pflugfelder SC, Kronish J, Alfonso EC, Dunn SP, Ullman S. Necrotizing keratitis caused by *Capnocytophaga ochracea*. Am J Ophthalmol. 1988;105:655-60.
91. Rubsamen PE, McLeish WM, Pflugfelder S, Miller D. *Capnocytophaga* endophthalmitis. Ophthalmology. 1993;100:45-69.
92. Parenti DM, Snyderman DR. *Capnocytophaga* species: Infections in nonimmunocompromised and immunocompromised hosts. J Infect Dis. 1985;151:140-7.
93. Li A, Tambyah P, Chan D, Leong KK. *Capnocytophaga sputigena* empyema. J Clin Microbiol. 2013;51:2772-4.
94. Beck JD, Eke P, Heiss G, Madianos P, Couper D, Lin D, et al. Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. Circulation. 2005;112:19-24.
95. Chan JF, Wong SS, Leung SS, Li IW, To KK, Cheng VC, et al. *Capnocytophaga sputigena* primary iliopsoas abscess. J Med Microbiol. 2010;59:1368-70.
96. Marín P, García-Martos P, Del Mar Álvarez M, Márquez J, Arroyo F, Mira J. Endocarditis caused by *Capnocytophaga sputigena*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1993;11:346.
97. Baranda M, Montejo, Acha Arrieta V, Hernandez Almaraz J, Perez Rodriguez M, Antonana Oraeta M, et al. Two cases of *Capnocytophaga* bacteremia, one with endocarditis. Can Med Assoc J. 1984;130:1420.
98. BuuHoi AY, Joundy S, Acar JF. Endocarditis caused by *Capnocytophaga ochracea*. J Clin Microbiol. 1988;26:1061-2.
99. Hsieh CJ, Hwang KP, Kuo KC, Hsueh PR. Facial cellulitis because of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* species in an immunocompetent patient. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44:149-51.
100. Duong M, Besancenot JF, Neuwirth C, Buisson M, Chavanet P, Portier H. Vertebral osteomyelitis due to *Capnocytophaga* species in immunocompetent patients: report of two cases and review. Clin Infect Dis. 1996;22:1099-101.
101. Piau C, Arvieux C, Bonnaure Mallet M, Jolivet Gougeon A. *Capnocytophaga* spp. involvement in bone infections: a review. Int J Antimicrob Agents. 2013;41:509-15.
102. Ebinger M, Nichterlein T, Schumacher UK, Manncke B, Schmidt D, Bohn I. Isolation of *Capnocytophaga* from an abscess in an immunocompetent adolescent. Clin Infect Dis. 2000;30:60-7.
103. Ricciardi B, Galgani I, Trezzi M, Toti M. Cerebral abscess caused by *Capnocytophaga* spp. in an immunocompetent subject: case report. Infez Med. 2008;16:162-3.
104. Rubino G, Correia A, Rodrigues F. [Frontal mass: diagnostic challenges]. Acta Med Port. 2012;25:197-8.
105. Mekouar H, Voortman G, Bernard P, Hutchings G, Boeras A, Rodríguez-Villalobos H. *Capnocytophaga* species and perinatal infections: case report and review of the literature. Acta Clinica Belgica. 2012;67:42-5.
106. Lopez E, Raymond J, Patkai J, El Ayoubi M, Schmitz T, Moriette G, et al. *Capnocytophaga* species and preterm birth: case series and review of the literature. Clin Microbiol Infect. 2010;16:1539-43.
107. Mayatepek E, Zilow E, Pohl S. Severe intrauterine infection due to *Capnocytophaga ochracea*. Biol Neonate. 1991;60:184-6.
108. Bass WT, DeLoach D, Khan JH, Green GA, Cunnion KM. Severe cystic periventricular leukomalacia in a premature infant with *Capnocytophaga* sepsis. AJP Rep. 2014;4:e73-6.
109. Douvier S, Neuwirth C, Filipuzzi L, Kisterman JP. Chorioamnionitis with intact membranes caused by *Capnocytophaga sputigena*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999;83:109-12.
110. Mercer LJ. *Capnocytophaga* isolated from the endometrium as a cause of neonatal sepsis. A case report. J Reprod Med. 1985;30:67-8.
111. Wang HK, Chen YC, Teng LJ, Hung CC, Chen ML, Du SH, et al. Brain abscess associated with multidrug-resistant *Capnocytophaga ochracea* infection. J Clin Microbiol. 2007;45:645-7.
112. Mazón A, Salvo S, Aechu M. Conjunctivitis caused by *Capnocytophaga ochracea* in a 2-year-old girl. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1995;13:264.
113. Wasserman D, Asbell PA, Friedman AJ, Bottone EJ. *Capnocytophaga ochracea* chronic blepharconjunctivitis. Cornea. 1995;14:533-5.
114. Winn RE, Chase WF, Lauderdale PW, McCleskey FK. Septic arthritis involving *Capnocytophaga ochracea*. J Clin Microbiol. 1984;19:538-40.
115. Krol-van Staaten MJ, Landheer JE, De Maat CEM. *Capnocytophaga canimorsus* (formerly DF-2) infections: Review of the literature. Neth J Med. 1990;36:304-9.
116. Pers C, Gahrn-Hansen B, Frederiksen W. *Capnocytophaga canimorsus* septicemia in Denmark, 1982-1995: Review of 39 cases. Clin Infect Dis. 1996;23:71-5.
117. Lion C, Escande F, Burdin JC. *Capnocytophaga canimorsus* infections in human: Review of the literature and cases report. Eur J Epidemiol. 1996;12:521-33.
118. De Boer MG, Lambregts PC, Van Dam AP, Van't Wout JW. Meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus*: When to expect the unexpected. Clin Neurol Neurosurg. 2007;109:393-8.
119. Sandoe JA. *Capnocytophaga canimorsus* endocarditis. J Med Microbiol. 2004;53:245-8.
120. Nettles RE, Sexton DJ. *Pasteurella multocida* prosthetic valve endocarditis: case report and review. Clin Infect Dis. 1997;25:920-1.
121. Sorbello AF, O'Donnell J, Kaiser-Smith J, Fitzharris J, Shinkarow J, Doneson S. Infective endocarditis due to *Pasteurella dagmatis*: case report and review. Clin Infect Dis. 1994;18:336-8.
122. Vasquez JE, Ferguson DA Jr, Bin-Sagheer S, Myers JW, Ramsak A, Wilson MA, et al. *Pasteurella multocida* endocarditis: a molecular epidemiological study. Clin Infect Dis. 1998;26:518-20.
123. McLinn SE, Nelson JD, Haltalin KC. Antimicrobial susceptibility of *Hemophilus influenzae*. Pediatrics. 1970;45:827-38.
124. Chapin KC, Doern GV. Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. J Clin Microbiol. 1983;17:1163-5.
125. Tsuzukibashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M, et al. A novel selective medium for isolation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. J Perodont Res. 2008;43:544-8.
126. Janda WM. Update on the HACEK group of fastidious gram-negative bacilli, part II. Clin Microbiol News. 2013;35:95-101.
127. Goldstein EJ, Agyare EO, Silletti R. Comparative growth of *Eikenella corrodens* on 15 media in three atmospheres of incubation. J Clin Microbiol. 1981;13:951-3.
128. Slee AM, Tanzer JM. Selective medium for isolation of *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. J Clin Microbiol. 1978;8:459-62.
129. Henriksen SD. Corroding bacteria from the respiratory tract. 1. *Moraxella kingae*. APMIS. 1969;75:85-90.
130. Yagupsky P. *Kingella kingae*: from medical rarity to an emerging paediatric pathogen. Lancet Infect Dis. 2004;4:32-41.
131. Yagupsky P, Weiss-Salz I, Fluss R, Freedman L, Peled N, Trefler R, et al. Dissemination of *Kingella kingae* in the community and long-term persistence of invasive clones. Pediatr Infect Dis J. 2009;28:707-10.
132. Gruber BF, Miller BS, Onnen J, Welling R, Wojtys EM. Antibacterial properties of synovial fluid in the knee. J Knee Surg. 2008;21:180-5.
133. Yagupsky P, Dagan R, Howard CW, Einhorn M, Kassis I, Simu A. High prevalence of *Kingella kingae* in joint fluid from children with septic arthritis revealed by the BA-CTEC blood culture system. J Clin Microbiol. 1992;30:1278-81.
134. Yagupsky P, Bar-Ziv Y, Howard CB, Dagan R. Epidemiology, etiology, and clinical features of septic arthritis in children younger than 24 months. Arch Pediatr Adolesc Med. 1995;149:537-40.
135. Yagupsky P. Use of blood culture vials and nucleic acid amplification for the diagnosis of pediatric septic arthritis. Clin Infect Dis. 2008;46:1631-2.
136. Gené Giral A, Palacín-Camacho E, Sierra Soler M, Carol RH. *Kingella kingae*: condiciones determinantes del crecimiento en botella de hemocultivo. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26:181-2.
137. Yagupsky P, Merires M, Bahar J, Dagan R. Evaluation of a novel vancomycin-containing medium for primary isolation of *Kingella kingae* from upper respiratory tract specimens. J Clin Microbiol. 1995;33:426-7.
138. Zbinden R. *Capnocytophaga canimorsus*: challenge for the clinical microbiologist. Med Microbiol Lett. 1995;4:217-23.
139. Ciantar M, Spratt DA, Newmann HN, Wilson M. Assessment of five culture media for the growth and isolation of *Capnocytophaga* spp. Clin Microbiol Infect. 2001;7:158-60.
140. Shawar R, Sepulveda J, Clarridge JE. Use of RapID-ANA system and sodium polyanetholsulfonate disk susceptibility testing in identifying *Haemophilus ducreyi*. J Clin Microbiol. 1990;28:108-11.
141. Avril JL, Donnio PY, Pouedras P. Selective médium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. J Clin Microbiol. 1990;28:1438-40.
142. Hamilton-Miller JMT. Distinguishing *Pasteurella* spp. from *Haemophilus* spp.: the problem revisited. Clin Microbiol Infect. 2002;8:245.
143. Valenza G, Ruoff C, Vogel U, Froesch M, Abel-Horn M. Microbiological evaluation of the new VITEK 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. J Clin Microbiol. 2007;45:3493-7.
144. Zbinden R, Von Graevenitz A. *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, *Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods. En:

- Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jørgensen J, Landry M, Warnock D, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 574-87.
145. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M35-A2. Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast. 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 146. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. Clin Microbiol Rev. 2014;27:214-40.
 147. Han XY, Falsen E. Characterization of oral strains of *Cardiobacterium valvarum* and emended description of the organism. J Clin Microbiol. 2005;43:2370-4.
 148. York MK. Highlights of CLSI Document - Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast - M35-A2, Second Edition. Clin Microbiol News. 2010;32:65-72.
 149. Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B; Subcommittee on the taxonomy of *Flavobacterium* and *Cytophaga*-like bacteria of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52:1049-70.
 150. Dees SB, Karr DE, Hollis D, Moss CW. Cellular fatty acids of *Capnocytophaga* species. J Clin Microbiol. 1982;16:779-83.
 151. Sønksen UW, Christensen JJ, Nielsen L, Hesselbjerg A, Hansen DS, Bruun B. Fastidious Gram-Negatives: Identification by the Vitek 2 *Neisseria*-*Haemophilus* Card and by Partial 16S rRNA Gene Sequencing Analysis. Open Microbiol J. 2010;4:123-31.
 152. Rennie RP, Brosnikoff C, Shokoples S, Reller LB, Mirrett S, Janda W, et al. Multi-center evaluation of the new Vitek 2 *Neisseria*-*Haemophilus* identification card. J Clin Microbiol. 2008;46:2681-5.
 153. Janda WM, Bradna JJ, Ruther P. Identification of *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., and other fastidious gram-negative bacteria with the MicroScan *Haemophilus*-*Neisseria* identification panel. J Clin Microbiol. 1989;27:869-73.
 154. Geissdörfer W, Tandler R, Schlundt C, Weyand M, Daniel WG, Schoerner C. Fatal bioprosthetic aortic valve endocarditis due to *Cardiobacterium valvarum*. J Clin Microbiol. 2007;45:2324-6.
 155. Yu PK, Rolfzen MA, Johnson RA, Hopkins MK, Anhalt JP. Application of quad-FERM+ for the identification of fastidious gram-positive and gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 1991;14:185-7.
 156. Powell EA, Blecker-Shelly D, Montgomery S, Mortensen JE. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of the fastidious pediatric pathogens *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Haemophilus*, and *Kingella*. J Clin Microbiol. 2013;51:3862-4.
 157. O'Hara CM. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2006;44:928-33.
 158. Vera Lizarazo YA, Rodríguez Ferri EF, Gutiérrez Martín CB. Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates. Res Vet Sci. 2008;85:453-6.
 159. Zangenah S, Güleriyüz G, Boräng S, Ullberg M, Bergman P, Ozenci V. Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF - a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:96-8.
 160. Allison K, Clarridge J E. Long-term respiratory tract infection with canine-associated *Pasteurella dagmatis* and *Neisseria canis* in a patient with chronic bronchiectasis. J Clin Microbiol. 2005;43:4272-4.
 161. Christensen H, Bisgaard M, Angen Ø, Frederiksen W, Olsen JE. Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. J Clin Microbiol. 2005;43:259-70.
 162. Funke G, Monnet D, De Bernard C, Von Graevenitz A, Freney J. Evaluation of the VITEK 2 System for rapid identification of medically relevant Gram-Negative rods. J Clin Microbiol. 1998;36:1948-52.
 163. Guillard T, Duval V, Jobart R, Brasme L, David C, De Champs C, et al. Dog bite wound infection by *Pasteurella dagmatis* misidentified as *Pasteurella pneumotropica* by automated system Vitek 2. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65:347-8.
 164. Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, Fisher MA. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2011;49:1104-6.
 165. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J Clin Microbiol. 2010;48:900-7.
 166. Haag AM, Taylor SN, Johnston KH, Cole RB. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Mass Spectrom. 1998;33:750-6.
 167. Nørskov-Lauritsen N, Bruun B, Andersen C, Kilian M. Identification of haemolytic *Haemophilus* species isolated from human clinical specimens and description of *Haemophilus sputorum* sp. nov. Int J Med Microbiol. 2012;302:78-83.
 168. Magnette A, Huang TD, Renzi F, Bogaerts P, Cornelis GR, Glupczynski Y. Improvement of identification of *Capnocytophaga canimorsus* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry using enriched database. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;84:12-5.
 169. Zangenah S, Ozenci V, Boräng S, Bergman P. Identification of blood and wound isolates of *C. canimorsus* and *C. cynodegmi* using VITEK2 and MALDI-TOF. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:2631-7.
 170. Ito S, Hagiya H, Kimura K, Nishi I, Yoshida H, Kioka HY, et al. *Capnocytophaga ochracea*-related bacterium bacteremia in a hypertrophic cardiomyopathy patient without neutropenia. Intern Med. 2016;55:2731-5.
 171. Bardou M, Honnorat E, Dubourg G, Couderc C, Fournier PE, Seng P, et al. Meningitis caused by *Pasteurella multocida* in a dog owner without a dog bite: clonal lineage identification by MALDI-TOF mass spectrometry. BMC Res Notes. 2015;8:626.
 172. Gautier AL, Dubois D, Escande F, Avril JL, Trieu-Cuot P, Gaillot O. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. J Clin Microbiol. 2005;43:2307-14.
 173. Frebourg NB, Berthelot G, Hocq R, Chibani A, Lemeland JF. Septicemia due to *Pasteurella pneumotropica*: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. J Clin Microbiol. 2002;40:687-9.
 174. Korczak B, Christensen H, Emler S, Frey J, Kuhnert P. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54:1393-9.
 175. Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Romito GA, Aquino DR, Cortelli SC, et al. Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: a clinical epidemiology study. Acta Odontol Scand. 2013;71:289-99.
 176. Zhou X, Liu X, Li J, Aprecio RM, Zhang W, Li Y. Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults. Clin Oral Invest. 2015;19:937-46.
 177. Salminen A, Kopra KA, Hyvärinen K, Paju S, Mäntylä P, Buhlin K, et al. Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. Front Cell Infect Microbiol. 2015;5:69.
 178. Figuero E, Lindahl C, Marín MJ, Renvert S, Herrera D, Ohlsson O, et al. Quantification of periodontal pathogens in vascular, blood, and subgingival samples from patients with peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysms. J Periodontol. 2014;85:1182-93.
 179. Gatselis N, Malli E, Papadamou G, Petinaki E, Dalekos GN. Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. J Clin Microbiol. 2006;44:669-72.
 180. Nikkari S, Gotoff R, Bourbeau PP, Brown RE, Kamal NR, Relman DA. Identification of *Cardiobacterium hominis* by broad-range bacterial polymerase chain reaction analysis in a case of culture-negative endocarditis. Arch Intern Med. 2002;162:477-9.
 181. Fenollar F, Lévy PY, Raoult D. Usefulness of broad-range PCR for the diagnosis of osteoarticular infections. Curr Opin Rheumatol. 2008;20:463-70.
 182. Ferroni A. Epidemiology and bacteriological diagnosis of paediatric acute osteoarticular infections. Arch Paediatr. 2007;14 Suppl 2:S91-6.
 183. Mounile K, Merckx J, Glorion C, Pouliquen JC, Berche P, Ferroni A. Osteoarticular infections caused by *Kingella kingae* in children; contribution of polymerase chain reaction to the microbiological diagnosis. Pediatr Infect Dis. 2003;22:837-9.
 184. Ståhelin J, Goledenberger D, Gnehm HE, Altwegg M. Polymerase chain reaction diagnosis of *Kingella kingae* arthritis in a young child. Clin Infect Dis. 1998;27:1328-9.
 185. Verdier I, Gayet-Ageron A, Ploton C, Taylor P, Benito Y, Freydiere AM, et al. Contribution of a broad range polymerase chain reaction to the diagnosis of osteoarticular infections caused by *Kingella kingae*: description of twenty-four recent pediatric diagnoses. Pediatr Infect Dis J. 2005;24:692-6.
 186. Ilhaerrebode B, Bidet P, Lorrot M, Even J, Mariani-Kurkdjian P, Ligouri S, et al. New real-time PCR-based method for *Kingella kingae* DNA detection: application to samples collected from 89 children with acute arthritis. J Clin Microbiol. 2009;47:1837-41.
 187. Chometon S, Benito Y, Chaker M, Boisset S, Ploton C, Bérard J, et al. Specific real-time polymerase chain reaction places *Kingella kingae* as the most common cause of osteoarticular infections in young children. Pediatr Infect Dis J. 2007;26:377-81.
 188. Furcht C, Eschrich K, Merte K. Detection of *Eikenella corrodens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by use of the polymerase chain reaction (PCR) in vitro and in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1996;23:891-7.
 189. Hayashi F, Okada M, Zhong X, Miura K. PCR detection of *Capnocytophaga* species in dental plaque samples from children aged 2 to 12 years. Microbiol Immunol. 2001;45:17-22.
 190. Hunt ML, Adler B, Townsend. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol. 2000;72:3-25.
 191. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M45-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
 192. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
 193. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100S. 26th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
 194. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Eucast. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0. 2017. Disponible en: <http://www.eucast.org>
 195. Coburn B, Toye B, Rawte P, Jamieson FB, Farrell DJ, Patel SN. Antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of HACEK organisms. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:1989-91.
 196. Feder HM Jr, Roberts JC, Salazar J, Leopold HB, Toro-Salazar O. HACEK endocarditis in infants and children: two cases and a literature review. Pediatr Infect Dis J. 2003;22:557-62.
 197. Kugler KC, Biedenbach DJ, Jones RN. Determination of the antimicrobial activity of 29 clinically important compounds tested against fastidious HACEK group organisms. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34:73-6.
 198. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren YA, Tyrrell KL, Fernandez HT. In vitro activities of garenoxacin (BMS-284756) against 170 clinical isolates of nine *Pasteurella* species. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:3068-70.
 199. Le Quellec A, Bessis D, Perez C, Ciurana AJ. Endocarditis due to beta-lactamase-producing *Cardiobacterium hominis*. Clin Infect Dis. 1994;19:994-5.

200. Lu PL, Hsueh PR, Hung CC, Teng LJ, Jang TN, Luh KT. Infective endocarditis complicated with progressive heart failure due to beta-lactamase-producing *Cardiobacterium hominis*. *J Clin Microbiol.* 2000;**38**:2015-7.
201. Madinier IM, Fosse TB, Hitzig C, Charbit Y, Hannoun LR. Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* 1999;**70**:888-92.
202. Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* 2004;**10**:98-118.
203. Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack KD, Smith AL. Characterization of non-beta-lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;**26**:235-44.
204. Barry AL, Fuchs PC, Pfaller MA. Susceptibilities of beta-lactamase-producing and nonproducing ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* to ceftibuten, cefaclor, cefuroxime, cefixime, cefotaxime, and amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;**37**:14-8.
205. Orden B, Martínez-Ruiz R, Millán R. Sensibilidad antibiótica de *Haemophilus* spp. en el Área 6 de la Comunidad de Madrid (2000-2004). *Rev Esp Quimioterap.* 2005;**18**:173-8.
206. Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* in systemic and nonoral infections in Finland. *APMIS.* 2003;**111**:653-7.
207. Coll-Vinent B, Surís X, López-Soto A, Miró JM, Coca A. *Haemophilus paraphrophilus* endocarditis: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1995;**20**:1381-3.
208. Yogeve R, Shulman D, Shulman ST, Glogowski WG. In vitro activity of antibiotics alone and in combination against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;**29**:179-81.
209. Malani AN, Aronoff DM, Bradley SF, Kauffman CA. *Cardiobacterium hominis* endocarditis: Two cases and a review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;**25**:587-95.
210. Maurissen W, Eyskens B, Gewillig M, Verhaegen J. Beta-lactamase positive *Cardiobacterium hominis* strain causing endocarditis in a pediatric patient with tetralogy of Fallot. *Clin Microbiol Newsl.* 2008;**30**:132-3.
211. Fowler VG Jr, Scheld WM, Bayer AS. Endocarditis and intravascular infections. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill-Livingstone/Elsevier; 2010. p. 1067-112.
212. Merriam CV, Citron DM, Tyrrell KL, Warren YA, Goldstein EJ. In vitro activity of azithromycin and nine comparator agents against 296 strains of oral anaerobes and 31 strains of *Eikenella corrodens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;**28**:244-8.
213. Lacroix JM, Walker C. Characterization of a beta-lactamase found in *Eikenella corrodens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;**35**:886-91.
214. Sordillo EM, Rendel M, Sood R, Belinfanti J, Murray O, Brook D. Septicemia due to beta-lactamase-positive *Kingella kingae*. *Clin Infect Dis.* 1993;**17**:818-9.
215. Arlet G, Sanson-Le Pors MJ, Casin IM, Ortenberg M, Perol Y. In vitro susceptibility of 96 *Capnocytophaga* strains, including a beta-lactamase producer, to new beta-lactam antibiotics and six quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;**31**:1283-4.
216. Citron DM, Warren YA, Fernandez HT, Goldstein MA, Tyrrell KL, Goldstein EJ. Broth microdilution and disk diffusion tests for susceptibility testing of *Pasteurella* species isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2005;**43**:2485-8.
217. Lion C, Conroy MC, Carpentier AM, Lozniewski A. Antimicrobial susceptibilities of *Pasteurella* strains isolated from humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;**27**:290-3.
218. Mortensen JE, Giger O, Rodgers GL. In vitro activity of oral antimicrobial agents against clinical isolates of *Pasteurella multocida*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;**30**:99-102.
219. Naas T, Benaoudia F, Lebrun L, Nordmann P. Molecular identification of TEM-1 beta-lactamase in a *Pasteurella multocida* isolate of human origin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;**20**:210-3.
220. Goldstein EJ, Citron DM, Richwald GA. Lack of in vitro efficacy of oral forms of certain cephalosporin, erythromycin, and oxacillin against *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;**32**:213-5.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Actualización en técnicas para diagnóstico microbiológico de infecciones fúngicas

Araceli Monzón de la Torre* y Alicia Gómez-López

Laboratorio de Referencia e Investigación en Micología, CNM-ISCIH, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Diagnóstico micosis
Infección fúngica
Medios de cultivo
Identificación
PCR
Aspergilosis
Candidiasis
Biomarcadores

Durante los últimos años se ha producido un incremento constante de las infecciones fúngicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y sometidos a terapias invasivas, en los que un diagnóstico precoz es importante para su tratamiento y evolución debido a la alta mortalidad ocasionada por estas infecciones. Dadas las limitaciones del diagnóstico clásico, basado en la recuperación, cultivo y estudio de las características macroscópicas y microscópicas del hongo, se están desarrollando y aplicando nuevas técnicas basadas en la detección de diferentes metabolitos, antígenos y ácidos nucleicos fúngicos, así como anticuerpos producidos en respuesta a la infección, que facilitan el diagnóstico rápido de estas infecciones, en especial cuando varias de estas técnicas se utilizan combinadas. Algunos de estos nuevos métodos, en general dotados de buena sensibilidad y fiabilidad, requieren metodologías complejas, personal experimentado y están disponibles en muy pocos laboratorios. El presente trabajo muestra una revisión de las técnicas disponibles y otras en desarrollo para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, su utilidad clínica y su posibilidad de utilización de forma rutinaria por los laboratorios clínicos y/o la necesidad de contar con laboratorios de referencia.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Microbiological diagnosis of fungal infections: an update

ABSTRACT

Keywords:

Diagnosis mycoses
Fungal infection
Culture media
Identification
PCR
Aspergillosis
Candidiasis
Biomarkers

Recent years have seen an increase in fungal infections, especially in immunocompromised patients undergoing invasive therapy. Conventional diagnosis methods based on culture are labour-intensive, time-consuming, have variable sensitivity, and in some cases are infeasible due to clinical factors. New assays such as detection of different metabolites, antigens, fungal nucleic acids and antibodies play an important role in the diagnosis and monitoring of response to therapy, especially when several of these techniques are used in combination.

Some of these new methods with good sensitivity and reliability require complex methodologies, experienced personnel and are available in very few clinical laboratories. We present a review of the available techniques and other investigational platforms that have recently emerged as promising tools for the diagnosis of fungal infections, their clinical utility and their potential routine use in clinical laboratories and/or the need to rely on reference laboratories.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: amonzon@isciii.es (A. Monzón de la Torre).

Introducción

Durante las últimas décadas, las infecciones fúngicas representan un papel cada vez más importante en la clínica, con un aumento constante en su prevalencia.

Todos los especialistas coinciden en señalar que el mayor número de pacientes inmunodeprimidos y la generalización de prácticas diagnósticas y terapéuticas agresivas son las principales causas del incremento de las micosis. A esto debemos añadir que algunas especies presentan una elevada tasa de resistencia a los antifúngicos, con lo que estas infecciones son cada vez más graves.

Estudios realizados en Estados Unidos y Europa indican que *Candida* spp. se encuentra entre los microorganismos aislados más frecuentemente en hemocultivos; representa un 5-10% de las sepsis nosocomiales y cada vez es más frecuente el aislamiento de especies distintas de *Candida albicans*.

Los hongos miceliales que con más frecuencia causan infecciones pertenecen al género *Aspergillus*, aunque en los últimos años también se está detectando un notable aumento en la incidencia de infecciones por otros géneros como *Scedosporium*, *Fusarium*, mucorales, etc. La mortalidad asociada a estas infecciones es muy elevada y, aunque está condicionada por el tipo de la enfermedad del huésped, se asume que para candidemia oscila entre el 25-45%, para aspergilosis invasiva (AI), entre el 30-90% y para otras especies, entre el 80-90%.

Con respecto a las infecciones fúngicas superficiales causadas fundamentalmente por dermatofitos, a pesar de su gran prevalencia, generan menos interés, quizá porque su diagnóstico y tratamiento no son muy complejos y, sobre todo, por su escasa capacidad para producir infecciones invasivas que pongan en peligro la vida del paciente.

También es importante reseñar que cada año se describen nuevas especies de hongos capaces de causar infecciones en humanos, principalmente en enfermos inmunodeprimidos.

Por otro lado, la aparición de nuevos compuestos y el desarrollo de pruebas estandarizadas para la detección de su actividad antifúngica conllevan la posibilidad de que los pacientes puedan ser tratados con varias alternativas, además de poder realizar cambios terapéuticos considerando la especie infectante y su sensibilidad. Otro punto a tener en cuenta es la identificación más precisa de las especies fúngicas debido al desarrollo y disponibilidad de técnicas moleculares, que han condicionado cambios taxonómicos importantes en los últimos años. Es el caso de algunas especies indistinguibles mediante métodos clásicos pero que presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos, lo que pone de manifiesto la importancia de una correcta identificación.

Como conclusión de todo lo anterior queda demostrada la importancia y necesidad de la identificación específica de los hongos, tanto levaduriformes como filamentosos.

Diagnóstico de micosis en el laboratorio

El diagnóstico correcto de las infecciones fúngicas debe basarse en una estrecha relación del clínico con el laboratorio, ya que una muestra mal recogida, transportada y/o procesada da lugar a errores en el diagnóstico y retrasos en un tratamiento que puede ser esencial para la vida del paciente, sobre todo en infecciones profundas en enfermos inmunocomprometidos causadas por hongos oportunistas.

En las infecciones superficiales pueden observarse lesiones más o menos típicas de un determinado agente etiológico, aunque estas lesiones también pueden indicar otra patología dermatológica y estar alteradas por tratamientos previos, sobre todo por corticoides.

Las micosis profundas presentan pocos signos o síntomas específicos y, a menudo, se requieren técnicas especiales, generalmente invasivas, para obtener muestras adecuadas, como humor vítreo en endoftalmitis, lavado broncoalveolar (LBA) y/o punción transtraqueal en infecciones pulmonares, líquido cefalorraquídeo (LCR), etc., para poder realizar el diagnóstico lo más rápido posible.

La función del laboratorio de micología en el diagnóstico de las infecciones fúngicas consiste en detectar, recuperar e identificar correctamente el hongo, de forma que se pueda aplicar el tratamiento adecuado lo más rápidamente posible, ya que cuanto antes se inicie el tratamiento específico más favorable será el resultado. En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de métodos rápidos y muy fiables que han contribuido a mejorar el manejo de la infección fúngica de gravedad. Los métodos clásicos de diagnóstico basados en el cultivo y en la observación directa del hongo en la muestra clínica, aunque siguen considerándose de referencia o *gold standard*, requieren de gran experiencia, índice de sospecha y, en general, adolecen de baja sensibilidad y especificidad^{1,2}, pero siguen siendo necesarios y de utilidad en la mayoría de los laboratorios asistenciales.

Los nuevos métodos no basados en el cultivo, en general dotados de buena sensibilidad y fiabilidad, requieren metodologías complejas, personal experimentado y están disponibles en muy pocos laboratorios.

A continuación se hace una breve descripción de los métodos más usados para el diagnóstico micológico.

Identificación clásica o convencional

La identificación clásica persigue la detección y el reconocimiento de estructuras específicas del hongo directamente en la muestra clínica y ahorran días o semanas en la recuperación e identificación de un hongo³. Los métodos utilizados para la recuperación e identificación del hongo causante de la infección se sustentan en:

- *Recogida, transporte y almacenamiento correcto de la muestra.* La cual siempre debería ir acompañada de la historia clínica del paciente (síntomas actuales, localización de la lesión, enfermedad de base, tratamientos con antimicrobianos, corticoides e inmunosupresores), incluyendo información sobre edad, sexo, profesión, nacionalidad, viajes y/o estancias en determinados países, contacto con animales, etc., ya que estos datos pueden sugerir la infección por determinados hongos, lo que permite dirigir el cultivo y las diferentes técnicas disponibles hacia ese grupo de hongos, facilitando su recuperación e identificación.

Algunas muestras deben tratarse como prioritarias dada su importancia. Son las denominadas "muestras nobles", como hemocultivos, biopsias, LBA, líquidos provenientes de broncoscopias, punción transtraqueal, LCR, etc.

- *Examen directo de la muestra.* Realizado por personal experimentado proporciona información importante para el diagnóstico y para sospechar si se trata de un hongo contaminante o del agente etiológico. Pueden reconocerse estructuras más o menos específicas de un hongo o grupo de hongos (formas levaduriformes de *Histoplasma* o *Sporothrix* en sangre y/o médula ósea, quistes de *Pneumocystis*, hifas anchas y no septadas de mucorales, hifas septadas y cabezas de *Aspergillus*). Esto permite adelantar un tratamiento empírico en espera del cultivo positivo.

Además sugieren al laboratorio la utilización de medios especiales para favorecer la recuperación del hongo.

- *Cultivo e identificación del hongo aislado.* Permiten aislar el hongo para su posterior identificación y estudio de sensibilidad a antifúngicos. En general se usan medios básicos con y sin antibacterianos y varios especiales elegidos según el origen de la muestra y/o la sospecha clínica, con algunas diferencias según se sospeche levadura o filamentosos.

Para los hongos levaduriformes es útil emplear un medio cromogénico que colorea las colonias y sugiere algunas especies, lo que permite sobre todo detectar cultivos mixtos (representan un 30%) y ofrece además una identificación presuntiva rápida. Por ejemplo, en Chrom-agar®, *C. albicans* presenta colonias verdes y *Candida tropicalis*, colonias azules⁴.

Su identificación clásica/convencional se basa en evaluar la capacidad del hongo para asimilar y transformar diferentes

sustratos como hidratos de carbono, fermentación de azúcares, etc. Estas pruebas bioquímicas están al alcance de casi todos los laboratorios asistenciales, ya que existen métodos comerciales, como ID 32C y API 20C AUX (BioMérieux), Auxacolor (BioRad), Fungicrom, etc. La mayoría de ellos están disponibles en formatos automatizados (VITEK2 de BioMérieux, Rapid Yeast Identification Panel MicroScan de Beckman-Coulter, etc.) y son fiables y bastante rápidos.

Siempre deben complementarse con un agar que permita el estudio morfológico (agar harina de maíz o agar arroz) mediante la visualización de las estructuras características, forma y tamaño de las blastoconidias, hifas, pseudohifas, clamidosporas, artroconidias, ascosporas, etc.

Ante la sospecha de *Cryptococcus* se utiliza la tinción con tinta china, que permite visualizar la cápsula (detecta la presencia del polisacárido capsular) y es particularmente útil en el diagnóstico de *Cryptococcus neoformans* en LCR. La presencia de levaduras encapsuladas es indicador de meningitis criptocócica.

Para el cultivo de hongos filamentosos se suele utilizar también agar extracto de malta (MEA), que favorece la esporulación, y agar Czapek Dox (CZP), específico para crecimiento y descripción de *Aspergillus* spp.

Dado que la identificación se realiza sobre la base de la forma y tipo de esporulación, se utilizan medios que la favorecen como agar patata dextrosa (APD), agar agua (AA), agar oat meal (OMA), etc. También es útil el microcultivo, que mejora la visualización de las estructuras características del hongo y su forma de esporulación (hifas, fialides, esporas). Se incuban a 28-30 °C durante un mínimo de 3 semanas, a diferencia de las levaduras, que crecen en 2 o 3 días, incluso para algunos como *Histoplasma*, *Trichophyton tonsurans*, *Exophiala* o *Alternaria* pueden ser necesarias hasta 6 semanas. Una vez obtenido un crecimiento adecuado de las colonias se realiza el examen microscópico, con el fin de observar estructuras características del hongo.

Su identificación clásica/convencional descansa en la observación de las características macroscópicas de la colonia y de las características microscópicas, es decir, la visualización de las estructuras características de reproducción sexual, asexual y morfología especial de las hifas, descritas en múltiples atlas micológicos⁵. Por tanto, la experiencia y formación del observador es fundamental e imprescindible.

Las preparaciones se realizan con lactofucsina, azul de lactofenol o agua destilada estéril. Existen 2 métodos que pueden usarse indistintamente, la toma con aguja de inoculación (para muestras cultivadas en tubos) es rápida y sencilla, pero deteriora las estructuras del hongo y puede dificultar la identificación, o la técnica de papel celofán (método Pelikan Roll Fix o su modificación utilizando Print Roller-adhesivo transparente)⁶.

Se puede asociar una serie de pruebas complementarias, con utilidad no claramente definida, que, basándose en la utilización de diversos compuestos, agar para dermatofitos (DTM), perforación de pelo, desdoblamiento de urea, utilización de agares *trichophyton*, crecimiento en medio de arroz, etc., ayudan a la identificación, fundamentalmente de los dermatofitos. Todas estas pruebas requieren lecturas entre 5 días y 2 semanas, lo que dificulta la identificación rápida del hongo.

Identificación molecular de la cepa aislada

La identificación clásica o convencional de levaduras y hongos filamentosos no permite una identificación precisa ni con la suficiente rapidez para el tratamiento adecuado en algunas especies (diferente sensibilidad a los antifúngicos de las distintas especies dentro de un mismo género). El importante avance que han experimentado las técnicas de biología molecular en los últimos años ha condicionado el desarrollo de nuevas técnicas con sensibilidad y especificidad ele-

vadas, que permiten una identificación más precisa de los hongos patógenos. Además, basándose en estas técnicas moleculares se han realizado estudios taxonómicos que han ocasionado cambios en la clasificación de los hongos patógenos humanos con una continua reclasificación de especies, algunas de las cuales son indistinguibles por métodos clásicos, pero presentan diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos.

Estas técnicas se basan en la amplificación (mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR) y secuenciación de diversos fragmentos de ADN, que corresponden a genes adecuados para la identificación de género y especie de los hongos. Preferentemente se amplifican fragmentos localizados en la región del ADN ribosomal (genes 5.8S, 18S y 28S). Estas secuencias tienen la particularidad de encontrarse repetidas n veces en el genoma fúngico (genes multicopia), lo que permite obtener buenos niveles de sensibilidad, así como mostrar gran variabilidad intraespecie, lo que favorece su especificidad.

Los métodos moleculares son de aplicación universal y contribuyen a la caracterización de especies fúngicas de forma exacta y rápida.

La técnica admite la posibilidad de realizar una reacción de PCR directa a partir de una colonia de la levadura problema aislada en medio de cultivo apropiado (habitualmente Sabouraud) y preparando una suspensión densa en agua estéril, de la que se añade la cantidad adecuada en el tubo de PCR. El mismo protocolo de PCR, con una fase inicial de desnaturalización a elevada temperatura, es suficiente para la ruptura de la pared de la célula levaduriforme y la liberación del material genético para su posterior amplificación de forma casi inmediata. Este "método directo" de amplificación de ADN no es, sin embargo, un método universal, y existen algunas especies de levaduras que requieren métodos alternativos con procesos de extracción de ADN más laboriosos, que necesitan varios pasos sucesivos para favorecer la ruptura de la pared y optimizar la recuperación del material genético de forma específica⁷.

Para las levaduras se amplifica la región del ADNr con la combinación de iniciadores ITS-1 + ITS-4, y si no hay amplificación se procede a la amplificación con las combinaciones: ITS-1 + ITS-2, ITS-3 + ITS-4, ITS-5 + ITS-4 y/o D1/D2.

En algunos casos particulares es muy útil amplificar además el fragmento IGS1, que proporciona información adicional sobre los genotipos circulantes y permite clasificar mejor algunas especies como *Trichosporon* y *Cryptococcus*⁸.

Para los hongos filamentosos, aunque se puede emplear este método rápido de extracción de ADN, habitualmente se utiliza el método clásico, en el que, a partir de una siembra de esporas en un medio apropiado, se incuba hasta que el micelio se desarrolle y forme un césped, al que se somete a un proceso de ruptura mecánica de la pared celular para la liberación del material genético y amplificación mediante PCR.

Además de la diana general, ITS, se utilizan otras dianas específicas de género:

- β -tubulina para *Aspergillus* y *Neosartoria*.
- Tubulina para *Scedosporium* spp.
- Factor de elongación EF1 α para *Fusarium*.
- Microsatélites para *Trichophyton* y *Microsporium*.
- D1-D2, citocromo B, etc.

Tras la amplificación, se purifica el producto de PCR, se secuencian y se analiza la secuencia comparándola con bases de datos de referencia (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Identificación mediante espectrometría de masas

Se trata de una técnica rápida y fiable para la identificación de microorganismos, basada en el perfil de proteínas (específico de cada especie) o en el análisis de ácidos nucleicos.

Es una técnica de ionización suave de la muestra, MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*; desorción/ionización por láser asistida por matriz) que permite el análisis de proteínas mediante un sistema TOF (*time of flight*; tiempo de vuelo). Los iones generados se separan en función de su relación masa/carga, y según esto se genera un espectro. Este espectro es específico de especie, por lo que cada microorganismo presenta siempre un espectro característico. Los espectros se incluyen en una base de datos, con la que se compara el espectro obtenido para identificar el microorganismo con un rango de concordancia⁹.

Se utilizan fundamentalmente 2 sistemas disponibles comercialmente, MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Alemania) y Axima® MALDI-TOF/MS, actualmente VITEK-MS (Shimadzu-Biomerieux).

La técnica puede realizarse a partir de un cultivo puro del hongo o a partir de una muestra clínica. La duración del proceso varía según el método y el equipo utilizado, reduciendo el tiempo de identificación en 5-7 días dependiendo del hongo.

Los rangos de identificación también son diferentes según el sistema utilizado, el sistema Bruker utiliza valores entre 0 y 3 (≥ 2 fiable a nivel de especie, entre 1,7-2 fiable a nivel de género y $< 1,7$ no fiable), mientras que el sistema Shimadzu-Biomerieux utiliza porcentajes ($\geq 70\%$ fiable a nivel de especie, entre 70-40% fiable a nivel de género y $< 40\%$ no fiable).

Diversos trabajos demuestran que esta técnica presenta una correlación con los métodos clásicos $> 95\%$ para las levaduras más habituales y $> 80\%$ para las infrecuentes. Además, permite diferenciar especies indistinguibles por métodos convencionales, como las incluidas en los complejos *Candida glabrata/bracarensis* o *Candida parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*^{10,11}.

En cuanto a hongos filamentosos, la correlación también es buena, consiguiéndose una identificación correcta a nivel de especie $> 90\%$ para especies como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y mucorales^{12,13}.

La correlación está claramente influenciada por los espectros incluidos en la base de datos del sistema pero, dado que los sistemas disponibles permiten incorporar nuevos espectros, es de esperar que mejore en un futuro próximo¹⁴.

Esta metodología también puede utilizarse para estudios de tipificación de brotes y de resistencia a antifúngicos¹⁵. Cada vez son más numerosos los laboratorios clínicos dotados de esta metodología, a pesar del elevado coste.

Métodos independientes del cultivo

Los métodos independientes del cultivo se basan en detectar antígenos (Ag), metabolitos y componentes fúngicos, anticuerpos (Ac) producidos frente al hongo o ADN directamente en la muestra clínica. Con ellos se intenta realizar un diagnóstico rápido para la instauración precoz del tratamiento antifúngico más efectivo, pero no permiten diferenciar entre colonización e infección.

Hay que tener en cuenta que las técnicas de detección de Ac están muy influenciadas por la patología del paciente y en enfermos inmunocomprometidos su producción está afectada, lo que dificulta su detección y origina falsos negativos. A pesar de esto, se dispone de varias técnicas de utilidad¹⁶.

Detección de antígeno capsular de *Cryptococcus*

Se dispone de una técnica de EIA (enzimoinmunoanálisis) y una técnica de aglutinación con partículas de látex, que es la más utilizada. En ella los Ac mono- o policlonales frente al polisacárido capsular (glucuroxilomanano) se fijan a las partículas de látex, las cuales reaccionan con la muestra y originan una precipitación. Es una técnica fácilmente utilizable en cualquier laboratorio, muy rápida (15-20 min) y su sensibilidad es del 99% en LCR para meningitis criptocócicas en paciente positivos al virus de la inmunodeficiencia humana.

La sensibilidad disminuye a un 75-80% en otros grupos de pacientes y en infecciones pulmonares¹⁷.

Además de en LCR, puede realizarse en otros líquidos orgánicos y en suero. Permite la titulación del Ag mediante diluciones seriadas para facilitar el seguimiento de la infección y evaluar la efectividad del tratamiento (semicuantitativa).

Es una de las técnicas independientes del cultivo más útiles y rápidas para diagnosticar criptocosis, pero puede dar falsos positivos en presencia de factor reumatoide, infección por *Trichosporon* y algunas neoplasias.

Una técnica recientemente desarrollada es el dispositivo de flujo lateral (LFD, *lateral flow device*), que ofrece fácil manejo, gran versatilidad y proporciona un diagnóstico rápido. Es una inmunocromatografía que utiliza una combinación de 2 Ac monoclonales, uno de ellos reacciona con Ag de los serotipos A, B y C, y el otro con Ag de los serotipos A y D, lo que permite identificar todos los serotipos y supone una ventaja en comparación con la aglutinación con látex o EIA, presentando una concordancia con dichas técnicas superior al 90%.

Puede realizarse en suero, plasma y LCR, con una sensibilidad y especificidad $> 99\%$ ^{18,19}.

Detección de antígenos y anticuerpos de *Candida*

Son técnicas útiles para el diagnóstico de candidiasis invasivas, ya que en ellas el hemocultivo solo aparece positivo en un 50% casos.

Para la detección de Ag se dispone de técnicas de aglutinación con partículas de látex y de detección de manano mediante ELISA (Platelia *Candida* Ag®, BioRad), esta última bastante más sensible y específica. Detecta la presencia de manano en suero utilizando un Ac monoclonal, EBCA1, que reconoce residuos β -1-5 manano de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *Candida guilliermondii*.

Respecto los Ac, las técnicas disponibles detectan Ac antimanano y antimicelio de *C. albicans*.

La detección de Ac antimanano se realiza en suero mediante una técnica de ELISA (Platelia *Candida* Ab/Ac/Ak®, BioRad). La técnica puede ser cuantitativa realizando diluciones seriadas, lo que permite titular la cantidad de Ac y relacionarlos con la evolución clínica y/o microbiológica del paciente²⁰⁻²².

La sensibilidad de estas técnicas mejora realizando la detección simultánea de Ag y Ac, para lo que disponemos de una técnica combinada (Platelia Ag Plus y Ab Plus®, BioRad) que presenta una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85%.

Se recomienda realizar determinaciones en muestras seriadas 2 veces por semana en pacientes de riesgo.

La técnica antimicelio o antitubos germinales de *C. albicans* es una técnica de inmunofluorescencia indirecta (Invasive Candidiasis [CAGTA] IFA IgG® Vircell S.L.), que detecta Ac específicos de tipo IgG frente a Ag de la fase micelial.

Aunque la utilidad de la detección de Ac frente al CAGTA para el diagnóstico y monitorización terapéutica de la candidiasis invasiva es clara, y un título $\geq 1/160$ es sugestivo de infección por *C. albicans*, es más útil su detección seriada en pacientes de riesgo²³.

Se realiza en suero y se evalúa la fluorescencia mediante microscopía según su localización en distintas zonas de los tubos germinales, siguiendo las indicaciones del fabricante. En general, las levaduras (blastoconidias) no presentan fluorescencia. La sensibilidad y la especificidad se estiman en el 84 y el 94%, respectivamente. Permite discriminar entre infección y colonización, ya que estos Ac únicamente se producen frente a los Ag de la pared celular de *Candida* cuando la levadura está infectando.

Detección de antígenos y anticuerpos de *Aspergillus*

El principal Ag utilizado para el diagnóstico de AI es el galactomanano (GM); es un polisacárido presente en la pared de la mayoría de especies de hifomicetos hialinos, fundamentalmente de *Aspergillus*,

el cual se libera durante la infección al producirse el crecimiento de las hifas y la invasión del tejido.

Su detección se realiza mediante técnica de ELISA en suero utilizando el Ac monoclonal EBA-2, que reconoce fundamentalmente *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Platelia Aspergillus EIA®, BioRad). Se recomienda realizar mediciones seriadas 2 veces por semana^{24,25}.

Pruebas positivas permitirían iniciar el tratamiento cuando la infección es aún subclínica y evaluar la respuesta al tratamiento, ya que la detección de un incremento significativo debe hacer pensar en fallo terapéutico²⁶.

Puede determinarse en otras muestras como LBA, LCR para diagnóstico de AI cerebral, orina o plasma, pero en general la sensibilidad es menor que en el suero^{25,27,28}.

En términos generales, la sensibilidad y la especificidad son buenas, > 85 y 90%, respectivamente, con un valor límite de positividad $\geq 0,7$ ng/ml en suero, pero se elevan al 96 y 98% si se considera un punto de corte dinámico de 2 muestras positivas separadas 3-4 días con cifras > 0,5 ng/ml. En AI puede aparecer positivo antes de que se observen signos clínicos y radiológicos, lo que permite el tratamiento precoz.

Las determinaciones seriadas 2 por semana son útiles para evaluar la respuesta al tratamiento y la evolución de la infección, ya que la cantidad de GM está relacionada con la carga fúngica y su elevación sugiere fallo terapéutico.

Se debe tener en cuenta que la sensibilidad y, en menor proporción, la especificidad están influenciadas por otros factores como: tipo de aspergilosis (posible, probable o probada), especie de *Aspergillus* (infecciones por *A. fumigatus* en pacientes oncohematológicos presentan concentraciones menores que las causadas por otras especies)²⁹, inmunidad del paciente, tratamientos antifúngicos previos (azoles), edad del paciente (la sensibilidad en niños es menor), trasplantes de órgano sólido y hemodiálisis (pueden aparecer valores elevados por acumulación al no filtrarse). Dependiendo de estos factores, la sensibilidad puede oscilar entre el 30 y el 99%.

Otro dato a tener en cuenta son las posibles reacciones cruzadas con otros hongos como *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Acremonium* y *Cryptococcus*. Destaca también el bajo valor predictivo positivo en algunos grupos de pacientes. Recientes estudios muestran evidencias de la falta de utilidad en pacientes en profilaxis³⁰⁻³².

Recientemente se ha desarrollado un nuevo LDF, LFD-Asp, útil, fácil de manejar y que proporciona un diagnóstico rápido de la AI. Se trata de una técnica inmunocromatográfica, que mediante un Ac monoclonal detecta una glucoproteína antigénica segregada por *Aspergillus* durante su crecimiento. Su unión sobre una membrana de nitrocelulosa origina una banda de precipitación visible (Aspergillus-Lateral-Flow Device, OLM diagnostics®). El Ac es muy específico para *Aspergillus* spp. y no se han descrito reacciones cruzadas con *Candida*, mucorales y *Fusarium*. Es una técnica rápida (15 min), con escasa necesidad de equipamiento y de manipulación de la muestra. Esto permitiría utilizarla como ensayo *point-of-care*. Puede realizarse tanto en suero como en LBA, en ambos presenta una elevada especificidad y sensibilidad^{33,34}.

Ha mostrado resultados alentadores en pacientes inmunocomprometidos con riesgo de desarrollar AI. Un metaanálisis incluyó 7 estudios entre 2008 y 2014 que mostraron alta sensibilidad (el 86 frente al 68%) y especificidad (el 93 frente al 87%) cuando se realizaron en muestras de LBA y suero. Otros estudios que la comparan con PCR-TR mostraron una especificidad similar, > 96%, y una sensibilidad menor, el 81 frente al 95%³⁵.

Referente a la detección de Ac en suero para el diagnóstico de aspergilosis, hay varias técnicas comercializadas; la más utilizada es la inmunodifusión doble o de Ouchterlony, con la que se visualizan bandas de precipitación formadas en la reacción Ag-Ac. La técnica puede acelerarse mediante la aplicación de un campo eléctrico, inmunoelectroforesis o contraelectroforesis. Son de gran utili-

dad en el diagnóstico de aspergiloma y de aspergilosis broncopulmonar alérgica.

Detección de metabolitos y otros componentes fúngicos

Existen otros componentes que se liberan durante la infección y son útiles para el diagnóstico, aunque algunos se encuentran en fase de desarrollo.

Detección de 1-3 β -D-glucano

El 1-3 β -D-glucano (BG) es un componente polisacárido de la pared de casi todos los hongos excepto de zigomicetos y muy escaso en criptococo. Se libera durante la infección y aparece en sangre y líquidos biológicos, y puede utilizarse como marcador de infección fúngica invasiva. Se trata de una técnica colorimétrica basada en la capacidad del BG de estimular el factor G de la vía de la coagulación en los amebocitos de cangrejo *Limulus polyphemus*, y que se pone de manifiesto mediante un sustrato cromogénico y una reacción diazo originando un compuesto coloreado medible (Fungitell® Associated of Cape Cod Incorporate).

La sensibilidad y especificidad son buenas, > 70 y 85%, respectivamente, aunque pueden existir falsos positivos en infecciones bacterianas concomitantes, tratamientos con inmunoglobulinas, sulfamidas, albúmina, cirrosis y hemodiálisis con membrana de acetato de celulosa. También se dan falsos positivos con la ingestión de algunos cereales como avena o cebada y sueros hemolizados.

Los límites de detección de la técnica oscilan entre 30 y 500 pg/ml. Se considera positivo un *cutt off* de 80 pg/ml, si se realizan determinaciones seriadas se recomienda un *cutt off* de 60 pg/ml.

Es útil en AI, candidiasis invasiva y neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, donde se detecta antes de la aparición de síntomas clínicos, lo que permite iniciar precozmente el tratamiento.

Como ocurre con otras técnicas similares, las determinaciones seriadas elevan su sensibilidad a más de 80% y adelantan la detección mediante hemocultivo en varios días^{36,37}.

Es una prueba útil para monitorizar y evaluar la efectividad del tratamiento, ya que sus valores disminuyen en respuesta al antifúngico³⁸.

Detección de ácidos nucleicos

La detección de ácido nucleico procedente del hongo directamente en la muestra clínica mediante diferentes técnicas (hibridación o amplificación) ha supuesto un importante avance en el diagnóstico micológico.

Hoy en día, gracias al desarrollo a gran escala de las técnicas genómicas, ya disponemos de una amplia variedad de procedimientos basados en la amplificación, mediante la PCR, para la detección de ácido nucleico de origen fúngico. La versatilidad de esta técnica, con diferentes formatos de detección en tiempo real (monoplex, dúplex, tríplex), permite la cuantificación e identificación de la presencia del hongo directamente en las muestras clínicas sin necesidad de cultivo, de forma rápida, sensible y específica, convirtiéndose en una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de micosis.

A pesar de sus grandes ventajas, uno de los principales problemas asociados a la utilización de la PCR en el diagnóstico micológico es la falta de estandarización de los procedimientos de extracción del ácido nucleico desde la muestra clínica, el tipo de dianas (específicas o universales) a amplificar y el formato de detección. La variedad de diseños ha reportado en ocasiones resultados contradictorios y, por tanto, de difícil aplicación.

Considerando estas dificultades existe una iniciativa europea (European *Aspergillus* PCR Initiative, EAPCRI) potenciada por diferentes expertos para establecer guías y recomendaciones a seguir por todos los laboratorios y aumentar la reproducibilidad de estas técnicas, que inicialmente se ha dirigido a la técnica de PCR para *Aspergillus* y, de

esta manera, favorecer su utilización en el diagnóstico de la AI³⁹. En el futuro, estas recomendaciones se harán extensivas a otras especies fúngicas y contribuirán a estandarizar estos procedimientos de modo que sea una técnica más incluida en los criterios de la EORTC/MSG para el diagnóstico de micosis.

Es importante destacar que ya se dispone de algunas técnicas comerciales de qPCR para el diagnóstico de *Aspergillus* y *Candida* con buenos resultados: SeptiFast (Roche), MagicPlex Sepsis (Izasa), FilmArray (BioFireDx), MycAssay *Aspergillus* (Mycosnostica). Los ensayos comerciales de PCR tienen la ventaja de proporcionar una metodología estandarizada y un aseguramiento de la calidad (procedimientos establecidos por el fabricante). La mayoría de las pruebas de PCR comerciales utilizan tecnología en tiempo real, proporcionando resultados rápidos, aunque en algunos casos la necesidad de incluir diferentes dianas en el formato multiplex (bacterias, hongos) limita la sensibilidad del ensayo y, en definitiva, su utilidad.

En el año 2014, la Food and Drug Administration americana aprobó el uso de una nueva metodología basada en la amplificación de ácidos nucleicos y su posterior detección mediante resonancia magnética (T2Candida), que permite el diagnóstico de candidemia en un tiempo estimado de 6 h a partir de una única muestra de sangre⁴⁰.

Otros formatos de detección basados en PCR también están dando resultados interesantes, como la detección de producto amplificado mediante espectrometría de masas^{41,42}.

Estas técnicas, aún en desarrollo y solo disponibles en unidades de investigación y centros de referencia, ofrecen prometedoras perspectivas en cuanto a que permitirán establecer un diagnóstico rápido y específico de las micosis.

Conclusión

Los nuevos retos asociados con el diagnóstico rápido y confiable de las micosis han permitido que técnicas moleculares como la PCR desempeñen un papel fundamental, junto con las técnicas clásicas de cultivo e identificación, en el diagnóstico y la monitorización de la respuesta a la terapia. Otros enfoques como la inmunocromatografía, la espectrometría de masas y la resonancia magnética han surgido recientemente como herramientas prometedoras para el diagnóstico de micosis invasivas, pero aún requieren estandarización y validación antes de que su uso pueda extenderse en la práctica clínica.

Conflicto de intereses

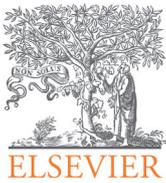
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Walsh TJ, Gamaletsou MN, McGinnis MR, Hayden RT, Kontoyiannis DP. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis.* 2012;54 Suppl 1:S55-60.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:609-22.
- Kwon-Chung KJ. *Medical Mycology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press; 2000.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2011. Disponible en: <http://www.clinicalfungi.org/>
- Rodríguez-Tudela JL, Aviles P. Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2604-5.
- White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rDNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols. A guide for Methods and applications*. Academic Press; 1990.
- Rodríguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4026-34.
- Mery A, Sendid B, Francois N, Cornu M, Poissy J, Guerardel Y, et al. Application of mass spectrometry technology to early diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2786-97.
- Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gomez-Lopez A, Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass

- spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:67-71.
- Bader O, Weig M, Tavernier-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1359-65.
 - Becker PT, De Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol.* 2014;52:826-34.
 - De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:475-84.
 - Panda A, Ghosh AK, Mirdha BR, Xess I, Paul S, Samantaray JC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *J Microbiol Methods.* 2015;109:93-105.
 - Quiles MI, Pelaez T, Rezusta LA, García-Rodríguez J. [Application of mass spectrometry in mycology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 Suppl 2:26-30.
 - Peman J, Zaragoza R. Combined use of nonculture-based lab techniques in the diagnosis and management of critically ill patients with invasive fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10:1321-30.
 - Saha DC, Xess I, Biswas A, Bhowmik DM, Padma MV. Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 8):1098-105.
 - Rivet-Danon D, Guitard J, Grenouillet F, Gay F, Ait-Ammar N, Angoulvant A, et al. Rapid diagnosis of cryptococcosis using an antigen detection immunochromatographic test. *J Infect.* 2015;70:499-503.
 - Vidal JE, Boulware DR. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57 Suppl 19:38-45.
 - Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care.* 2010;14:R222.
 - Ahmad S, Khan Z. Invasive candidiasis: a review of nonculture-based laboratory diagnostic methods. *Indian J Med Microbiol.* 2012;30:264-9.
 - Chumpitazi BF, Lebeau B, Faure-Cognet O, Hamidfar-Roy R, Timsit JF, Pavese P, et al. Characteristic and clinical relevance of *Candida* mannan test in the diagnosis of probable invasive candidiasis. *Med Mycol.* 2014;52:462-71.
 - Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Loza A, Zakariya I, et al. Contribution of *Candida* biomarkers and DNA detection for the diagnosis of invasive candidiasis in ICU patients with severe abdominal conditions. *Crit Care.* 2016;20:149.
 - Swoboda-Kopec E, Sikora M, Piskorska K, Golas M, Netsvaytayaeva I, Przybylowska D, et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;944:27-33.
 - Fortun J, Martín-Davila P, Gomez Garcia de la Pedrosa E, Silva JT, Garcia-Rodríguez J, Benito D, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients. *J Infect.* 2016;72:738-44.
 - Boluk G, Kazak E, Ozkalemkas F, Ener B, Akalin H, Agca H, et al. Comparison of galactomannan, beta-D-glucan, and *Aspergillus* DNA in sera of high-risk adult patients with hematological malignancies for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Turk J Med Sci.* 2016;46:335-42.
 - Eigl S, Hoenigl M, Spiess B, Heldt S, Prattes J, Neumeister P, et al. Galactomannan testing and *Aspergillus* PCR in same-day bronchoalveolar lavage and blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol.* 2017;55:528-34.
 - Lahmer T, Neuenhahn M, Held J, Rasch S, Schmid RM, Huber W. Comparison of 1,3-beta-D-glucan with galactomannan in serum and bronchoalveolar fluid for the detection of *Aspergillus* species in immunosuppressed mechanically ventilated critically ill patients. *J Crit Care.* 2016;36:259-64.
 - Canton Lacasa E, García-Rodríguez J, Guinea Ortega JV, Martín-Mazuelos E, Peman García J. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. SEIMC; 2012.
 - Eigl S, Prattes J, Reinwald M, Thornton CR, Reischies F, Spiess B, et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the *Aspergillus*-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:401-5.
 - Heng SC, Morrissey O, Chen SC, Thursky K, Manser RL, Nation RL, et al. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Microbiol.* 2015;41:124-34.
 - Loeffler J, Hafner J, Mengoli C, Wirth C, Heussel CP, Löffler C, et al. Prospective biomarker screening for the diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk paediatric patients. *J Clin Microbiol.* 2017;55:101-9.
 - Alvarez E. [Utility of *Aspergillus*-LFD: first experience in Chile]. *Rev Chilena Infectol.* 2015;32:117-9.
 - Pan Z, Fu M, Zhang J, Zhou H, Fu Y, Zhou J. Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis. *J Med Microbiol.* 2015;64:702-7.
 - White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1510-6.
 - He S, Hang JP, Zhang L, Wang F, Zhang DC, Gong FH. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48:351-61.

37. Martin-Mazuelos E, Loza A, Castro C, Macias D, Zakariya I, Saavedra P, et al. beta-D-Glucan and *Candida albicans* germ tube antibody in ICU patients with invasive candidiasis. *Intensive Care Med.* 2015;41:1424-32.
38. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* 2012;54:633-43.
39. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical Performance of *Aspergillus* PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European *Aspergillus* PCR Initiative. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2832-7.
40. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60:892-9.
41. Alanio A, Garcia-Hermoso D, Mercier-Delarue S, Lanternier F, Gits-Muselli M, Menotti J, et al. Molecular identification of Mucorales in human tissues: contribution of PCR electro-spray-ionization mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:594-5.
42. Kaleta EJ, Clark AE, Cherkaoui A, Wysocki VH, Ingram EL, Schrenzel J, et al. Comparative analysis of PCR-electrospray ionization/mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/MS for the identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles. *Clin Chem.* 2011;57:1057-67.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Enfermedades exantemáticas virales: aspectos clinicoepidemiológicos y de laboratorio

Aurora Fernández García^{a,b}, Serena Villaverde González^c, Juan Emilio Echevarría Mayo^{a,b},
María José Cilleruelo Ortega^c y Fernando de Ory Manchón^{a,b,*}

^aCentro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBER ESP), Madrid, España

^cHospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

Exantemas virales
Sarampión
Rubéola
Eritema infeccioso
Exantema súbito
Varicela
Enfermedad boca-mano-pie
PCR
Diagnóstico serológico

Los cuadros exantemáticos tienen frecuentemente origen infeccioso; los virus son una causa importante de exantema. Los exantemas más relevantes son, entre los maculopapulosos, el sarampión, la rubéola, el eritema infeccioso y el exantema súbito y, entre los vesiculoampollosos, la varicela, el zóster y la enfermedad boca-mano-pie. Algunas de las anteriores, y otras infecciones virales, causan exantemas purpúricos que pueden ser de mayor gravedad. El diagnóstico de laboratorio se realiza de forma directa, mediante el aislamiento, la detección de antígenos o la detección del ácido nucleico viral, siendo esta última la aproximación más adecuada; o, serológicamente, por detección de IgM específica, que proporciona diagnóstico temprano, o de seroconversión. En general, ambas herramientas metodológicas se complementan para mejorar el rendimiento diagnóstico. La caracterización molecular es una importante actividad de laboratorio, especialmente para los virus del sarampión y de la rubéola, en el contexto del plan de eliminación de estas enfermedades.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Exanthematous viral diseases: clinical and laboratory aspects

ABSTRACT

Keywords:

Viral Exanthems
Measles
Rubella
Erythema Infectiosum
Exanthema Subitum
Chickenpox
Hand-Foot-and-Mouth Disease
PCR
Serological Diagnosis

Exanthematous diseases frequently have an infectious origin; viruses are a major cause of rashes. The most notable maculopapular rashes are measles, rubella, infectious erythema and exanthem subitum, while the vesicular rashes include varicella (and zoster) and hand-foot-and-mouth disease. Some of the above and other viral infections cause purpuric rashes, which may be more severe. Laboratory diagnosis is performed directly, by viral isolation, antigen detection or viral nucleic acid detection, the latter being the best approach; or serologically, by detection of specific IgM (providing rapid diagnosis) or seroconversion. Both methodological tools generally complement each other to improve diagnostic performance. Molecular characterization is an important laboratory procedure, especially for the measles and rubella viruses, in the context of the plan for the elimination of these diseases.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para la correspondencia.

Correo electrónico: fory@isciii.es (F. de Ory Manchón).

Introducción

Un exantema es una erupción en la piel que puede tener múltiples causas, entre las que se incluyen inflamaciones, reacciones a medicamentos e infecciones. Los exantemas infecciosos pueden estar causados por bacterias, parásitos y virus. Las enfermedades exantemáticas más frecuentes en la infancia están producidas por virus: sarampión (primera enfermedad), rubéola (tercera), varicela (cuarta), eritema infeccioso (quinta) y exantema súbito (sexta enfermedad). Además, otros virus producen también enfermedad exantemática de forma menos frecuente (tabla 1). De estas enfermedades, el sarampión y la rubéola se encuentran en proceso de eliminación promovido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), puesto que son enfermedades que presentan características que lo hacen posible: el ser humano es su único reservorio; existe una vacuna segura y efectiva que produce una inmunidad duradera; el virus no produce infección crónica, y existen métodos de diagnóstico sensibles y específicos. En España está en vigor el Plan Nacional de Eliminación del Sarampión desde el año 2000¹, en el que se incluyó la eliminación de la rubéola y el síndrome de rubéola congénita (SRC) en el año 2008. Este plan concreta los objetivos coordinados para conseguir y mantener la eliminación de estas 2 enfermedades. A medida que se progresa hacia la eliminación se hará más relevante el diagnóstico etiológico de los exantemas virales. En este contexto resulta de gran interés la revisión de los aspectos clínicos, epidemiológicos, de diagnóstico de laboratorio y de caracterización molecular de los virus que producen exantemas.

Enfermedades exantemáticas virales: aspectos clinicoepidemiológicos

Existen diversas clasificaciones de los exantemas virales; la más utilizada se refiere a las características clínicas y los divide básicamente en 2 grupos: exantemas maculopapulosos y vesiculoampollosos (tabla 1). Algunos virus que producen estos tipos de exantemas (virus dengue [VD], virus sarampión [VS]) —junto con otros menos frecuentes (virus del Ébola, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-

Congo)— pueden producir igualmente exantemas purpúricos de mayor gravedad.

Exantemas maculopapulosos

Sarampión. Es una infección altamente contagiosa producida por un virus de la familia *Paramyxoviridae*, que contiene ARN monocatenario como material genético. El genoma de este virus está formado por 6 unidades de transcripción que codifican la nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de la matriz (M), proteína de fusión (F), hemaglutinina (H) y la ARN polimerasa². Se transmite por vía respiratoria, infectando el tracto respiratorio superior y los ganglios linfáticos regionales. Las personas infectadas pueden transmitir el virus desde 4 días antes del comienzo del exantema hasta 4 después de su desaparición³.

La OMS se ha planteado la eliminación del sarampión, sobre la base de una elevada cobertura vacunal (> 95%) y de un sistema de vigilancia epidemiológico exhaustivo, basado en el estudio individual de casos^{4,5}.

La vacuna triple viral (rubéola, sarampión y parotiditis) se introdujo en España en 1981 y modificó sustancialmente la incidencia de sarampión, que actualmente es < 1 caso/100.000 habitantes, con una cobertura vacunal superior al 95% a nivel nacional. En cuanto a la vigilancia epidemiológica, con el establecimiento del Plan Nacional de Eliminación del Sarampión¹ pasó a ser una enfermedad de declaración obligatoria urgente; por lo que cada caso sospechoso (con fiebre, temperatura corporal superior a 38 °C y exantema maculopapuloso con al menos 1 de estos 3 síntomas: tos, rinitis/coriza y conjuntivitis⁶) debe ser declarado a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) e investigado de forma exhaustiva⁶.

A pesar de los esfuerzos realizados, el sarampión continúa siendo una de las principales causas de mortalidad infantil en el mundo, con 134.200 muertes en 2015⁷. Además, se considera una enfermedad reemergente en los países desarrollados, donde en los últimos años se están registrando grandes brotes. En Europa ha habido un aumento notable del número de casos desde 2010⁸. En España se produjo en 2011 un aumento de la incidencia a 7,45 casos/100.000 habitantes y se confirmaron 5.107 casos entre 2011 y 2012, con declaración de casos en todas las comunidades autónomas^{9,10}. Estos brotes se deben a la acumulación de individuos susceptibles en determinados grupos de población (lactantes con edad inferior a la de vacunación [< 12 -15 meses], individuos nacidos en la época del establecimiento de la vacunación, población nómada o marginal sin vacunar), y a la aparición de movimientos antivacunas. Afortunadamente, estas cifras han descendido hasta las actuales (en torno a 0,08 casos/100.000 habitantes en 2015) y desde 2014 se ha conseguido, además, eliminar la transmisión endémica¹¹.

Desde el punto de vista clínico, se puede dividir la infección en 4 fases. El período de incubación dura de 7 a 18 días, habitualmente 12 días tras la entrada del virus en el tracto respiratorio superior, con replicación a este nivel y diseminación al torrente sanguíneo, dando lugar a una primera viremia. De forma típica, los pacientes permanecen asintomáticos durante este período. Posteriormente tiene lugar una segunda viremia que marca el inicio de la fase prodrómica, en forma de cuadro catarral asociado a fiebre elevada, conjuntivitis, tos y aparición en algunos casos de las patognomónicas manchas de Koplik (lesiones puntiformes blanco-grisáceas en mucosa bucal opuesta a los molares inferiores). Esta fase suele durar 2-4 días y se intensifica en las 24-48 h previas a la aparición del exantema. A continuación se desarrolla un exantema maculopapuloso eritematoso que comienza en la cabeza y se extiende de forma caudal y centrífuga, en ocasiones de forma confluyente, resolviéndose con el mismo patrón y dejando una coloración parduzca y descamación. La extensión de las lesiones cutáneas se relaciona con la gravedad de la infección. Durante la fase exantemática pueden observarse datos de infiltración del sistema reticuloendotelial en for-

Tabla 1
Enfermedades exantemáticas más frecuentes causadas por virus

	Virus	Enfermedad
Exantemas maculopapulosos	Sarampión	Sarampión
	Rubéola	Rubéola
	<i>Erythrovirus</i> B19	Eritema infeccioso
	Herpesvirus humano 6	Exantema súbito
	Herpesvirus humano 7	
	Enterovirus	Enfermedad por enterovirus
	Epstein Barr	Mononucleosis infecciosa
	Citomegalovirus	
	Dengue	Dengue
	Chikungunya	Fiebre chikungunya
Zika	Enfermedad por zika	
Exantemas vesiculoampollosos	Herpes simple	Herpes
	Varicela-zóster	Varicela y herpes zóster
	Coxsackie, enterovirus 71	Enfermedad boca-mano-pie

ma de adenopatías cervicales, esplenomegalia y adenitis mesentérica. Finalmente, tiene lugar la fase de recuperación, en la que desaparecen el exantema y la fiebre¹². Tanto la fiebre como el exantema pueden no aparecer en niños muy pequeños, pacientes inmunodeprimidos, niños malnutridos y en individuos previamente vacunados².

La tasa global de complicaciones se acerca al 30%, y las más comunes son las que derivan de la supresión transitoria de la respuesta de células T producida por la infección de estas células por el virus, y que predisponen al desarrollo de infecciones bacterianas graves: fundamentalmente neumonía y otitis media¹³. Asimismo, se han descrito complicaciones neurológicas en forma de encefalitis aguda producida de forma directa por el virus o como respuesta autoinmune posinfecciosa en el caso de la encefalomielititis aguda diseminada. Por último cabe reseñar la panencefalitis esclerosante subaguda (PEES), enfermedad degenerativa con desenlace fatal que ocurre de 7 a 10 años tras la infección, generalmente en niños que presentaron la enfermedad durante el primer año de vida, debido a inmadurez en la inmunidad celular. La PEES está relacionada con cepas del virus que escapan a la respuesta inmune y persisten en neuronas y células gliales del cerebro. En la PEES se han considerado relevantes las mutaciones en las proteínas M, F y H¹⁴.

Rubéola. Está producida por un virus de la familia *Togaviridae* que contiene ARN monocatenario como material genético¹⁵. Es una enfermedad de transmisión respiratoria. En España, desde la introducción de la vacunación, el descenso en su incidencia ha sido notable; especialmente después de alcanzarse coberturas superiores al 95%. Es obligatoria la declaración individualizada de cada caso a la RENAVE. En la actualidad se trata de una infección de muy baja incidencia en España: 0,009 casos/100.000 habitantes en 2015¹¹.

La mayor trascendencia de la rubéola es la infección durante el embarazo, que puede ocasionar transmisión intrauterina y dar lugar al SRC. Por ello, la OMS ha elaborado un plan estratégico de prevención de la infección congénita por rubéola. Entre otros puntos, se establece que la protección frente al virus de las mujeres en edad fértil debe ser superior al 95%. A pesar de que en la mayor parte de las regiones de Europa la cobertura vacunal supera el 95%, en algunos países (Italia, Rumanía, Polonia) la vacunación se ha introducido de forma sistemática durante la última década; por lo que hay una alta susceptibilidad a la infección, lo que explicaría los últimos brotes de rubéola en estos países^{16,17} y los casos detectados en España en personas procedentes de dichos países.

La enfermedad comienza con una fase prodrómica (que sigue a un período de incubación de 14-21 días) caracterizada por febrícula asociada típicamente a adenopatías retroauriculares y occipitales dolorosas, que suele durar 24-48 h. Posteriormente aparece un exantema maculopapuloso no confluyente, rosáceo, con extensión cefalocaudal; en el 20% de los casos aparecen las manchas de Forchheimer en paladar blando, no específicas de rubéola¹⁸. De acuerdo con la RENAVE, la definición de caso se refiere a la aparición súbita de un exantema maculopapuloso generalizado y debe cumplir al menos uno de los 5 criterios siguientes: adenopatía cervical, suboccipital o retroauricular, artralgias y artritis⁵.

La infección congénita es más grave cuanto más precoz sea la infección durante el embarazo. El SRC clásico se caracteriza por la tríada de Gregg (cardiopatía, microcefalia, sordera y cataratas) que aparece en el 85-90% de los fetos infectados antes de la semana 12 de gestación. Si la infección materna tiene lugar entre las 12 y las 16 semanas, el 15% de los fetos presenta sordera y, en menor proporción, defectos oculares y microcefalia. Cuando la infección se produce entre las 16 y las 20 semanas, el riesgo de sordera es mínimo y en infecciones adquiridas a partir de las 20 semanas de gestación no se han descrito secuelas congénitas. Sin embargo, cuando la infección materna se produce al final del embarazo, el recién nacido podría presentar infección sistémica con erupción generalizada y lesiones purpúricas, aunque sin presentar malformaciones asociadas¹⁹.

Eritema infeccioso (megaloeritema o quinta enfermedad). Causado por el *Erythrovirus* B19 (EB19), familia *Parvoviridae*. Es un virus con ADN monocatenario, cuya característica más importante es su afinidad por el antígeno P eritrocitario. Esta condición conduce a la replicación en las células madre eritroides y es causa de crisis aplásicas transitorias en los pacientes infectados con enfermedad hematológica previa²⁰. Se transmite por vía respiratoria y parenteral.

Se trata de una infección frecuente, con una prevalencia que aumenta con la edad. Aparece fundamentalmente en primavera y verano, con brotes cada 3 años. El cuadro clínico comienza con manifestaciones inespecíficas como fiebre, mialgias y cefalea y el exantema aparece 7-10 días después. El exantema típico comienza en la cara, con aspecto de "mejillas abofeteadas"; días más tarde se extiende al tronco, y finalmente se desvanece dando lugar a un aclaramiento central (exantema reticular en encaje). La infección en el adulto puede producir un exantema atípico (p. ej., en forma de guante-calcetín)²¹, o artritis o artralgias, que pueden persistir durante meses. Cabe destacar que la infección primaria durante el embarazo puede desencadenar anemia fetal grave con una elevada morbimortalidad.

Exantema súbito (roséola infantil o sexta enfermedad). Los agentes causales de esta enfermedad típica de la edad pediátrica son los virus del herpes humano (VHH) tipo 6 (VHH-6) —fundamentalmente VHH-6B— y menos frecuentemente el VHH-7 (familia *Herpesviridae*). El 90% de los casos se produce entre los 6 meses y los 3 años; se presenta en forma de fiebre elevada durante 3-5 días y el exantema rosáceo aparece coincidiendo con la desaparición de la fiebre²². Además pueden asociarse síntomas de vías respiratorias superiores o gastrointestinales. Se ha relacionado la infección con convulsiones febriles benignas. Se trata de una infección de muy buen pronóstico que no requiere tratamiento.

Exantemas vesiculoampollosos

Varicela. Es la enfermedad resultante de la primoinfección por el virus varicela-zóster (VZV), de la familia *Herpesviridae*, que también incluye los virus herpes simple (VHS) 1 y 2. La principal característica biológica de la familia es la capacidad de establecer latencia después de producir la infección primaria; en el caso del VZV, la latencia se establece en los ganglios de las raíces dorsales; en VHS-1, en el ganglio sensorial del trigémino, y en VHS-2, en el ganglio sensorial lumbosacro. La reactivación de los virus produce herpes zóster, herpes labial y herpes genital, respectivamente²³.

La transmisión de VZV se produce por 3 vías. La más frecuente es por contacto directo con las vesículas de la piel, aunque también puede tener lugar por vía respiratoria. Además, existe la posibilidad de transmisión vertical en caso de infección aguda durante el embarazo. El virus se replica en el tracto respiratorio superior y se disemina infectando los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo principalmente. Se trata de una enfermedad altamente contagiosa cuyo período de contagio comprende desde 1-3 días antes de que aparezcan las lesiones cutáneas hasta que solo aparecen costras.

La varicela es de distribución mundial y su incidencia anual suele coincidir con la tasa de nacimientos de cada país; afecta en un 85-90% a menores de 10 años. En España es una enfermedad de declaración obligatoria. Estudios de seroprevalencia muestran que más del 95% de los mayores de 15 años son inmunes a la varicela²⁴. En la actualidad existe una vacuna disponible, de virus vivos atenuados, de aplicación sistemática en España desde 2016. La pauta es de 2 dosis a los 15 meses, a los 3-4 años y a los 12 años en las personas que refieran no haber pasado la enfermedad (también en pauta con 2 dosis). Se hace así con el objetivo de que todos los adolescentes estén inmunizados al terminar la edad pediátrica²⁵, dado que la enfermedad es más grave en el adulto.

El período de incubación es de 10 a 21 días (media 14-16 días). Comienza con fiebre, malestar general y rechazo de la ingesta. Las

lesiones cutáneas aparecen 24 h después. Inicialmente son pápulas rojas que progresan con rapidez a vesículas no umbilicadas sobre base eritematosa. Posteriormente, las vesículas se ulceran, forman costra y cicatrizan. De forma típica, las lesiones se encuentran en un mismo paciente en diferentes estadios (pápula, vesícula y costra) y son muy pruriginosas. En los pacientes vacunados el exantema es menos aparente.

La complicación más frecuente de la varicela es la sobreinfección bacteriana de piel y tejidos blandos, fundamentalmente por *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus pyogenes*. Además se han descrito complicaciones respiratorias (neumonía, otitis) en 1/400 adultos; neurológicas (ataxia, síndrome de Guillain Barré) en 1/1.000 casos, y hematológicas (púrpura de Schönlein Henoch)²⁶. La varicela congénita ocurre en el 2% de embarazos de mujeres que presentan la varicela entre las semanas 8 y 26. Se caracteriza por atrofia de miembros y afectación ocular y del sistema nervioso central. Si la infección materna tiene lugar entre 5 días antes del parto y 2 días después, hasta el 31% de los recién nacidos desarrollan varicela neonatal: un cuadro multivisceral grave que cursa con neumonía, hepatopatía y afectación neurológica y que presenta elevada mortalidad.

Tras la resolución de la varicela, el sistema inmune impide la replicación viral del VVZ, que establece infección latente en los ganglios dorsales. Como consecuencia de un descenso en la inmunidad celular, el virus se puede reactivar y producir las manifestaciones típicas del herpes zóster. El 75% de los casos ocurre en mayores de 45 años y solo un 5% en menores de 15 años. La incidencia de herpes zóster aumenta en los pacientes inmunodeprimidos. Antes de la erupción cutánea, los pacientes refieren dolor e hipersensibilidad localizados a lo largo de un dermatoma concreto (neuritis aguda). Días después aparece —en ese lugar y siempre siguiendo el recorrido del dermatoma— una erupción papulosa que rápidamente progresa a vesículas. Al igual que ocurre en la varicela, estas lesiones evolucionan a costra²⁷. Cuando la afectación tiene lugar en ciertos pares craneales puede dar lugar a síndromes característicos, como es el caso del síndrome de Ramsay Hunt, en el que se afecta el VII par craneal, produciendo parálisis facial y vesículas en el conducto auditivo. Es típica la neuralgia postherpética aproximadamente 1 mes después de la resolución de las lesiones, definida como dolor persistente en la misma región.

Enfermedad boca-mano-pie. Es una enfermedad típica de menores de 10 años (máxima incidencia entre 1 y 3 años) consistente en la aparición de pequeñas úlceras en la mucosa oral seguida de erupción de vesículas con halo eritematoso en manos y pies, y en ocasiones en el área del pañal. Además, puede acompañarse de fiebre y síntomas catarrales leves. Las complicaciones neurológicas o respiratorias son muy raras. En la mayor parte de los casos está provocada por el virus Cocksackie (VCo) A16 y por el Enterovirus (EV) 71; se han producido casos y brotes por VCo A6 y VCo A10, con una frecuencia aumentada de las complicaciones neurológicas y de la mortalidad²⁸. Se transmite por vía fecal-oral o por contacto con el líquido de las ampollas.

Enfermedades exantemáticas virales: diagnóstico de laboratorio

En general, en el momento inicial del cuadro exantemático viral (y durante unos pocos días) el virus puede ser recuperado de la muestra clínica adecuada. Días después comienza la respuesta específica de anticuerpos. Así, se diferencian 2 procedimientos de laboratorio para el diagnóstico: de forma directa, mediante la identificación del agente causal, e indirectamente, mediante la identificación de respuesta serológica específica. Ambas aproximaciones son complementarias y se deben valorar en el contexto clínicoepidemiológico.

Diagnóstico directo

Las enfermedades exantemáticas están causadas por virus de familias muy diferentes, pero comparten similitudes en su patogenia.

En general son infecciones de transmisión aérea o a través de fómites, con entrada por mucosa respiratoria o digestiva, donde se produce replicación local seguida de colonización de ganglios locales y viremia primaria, mediante la cual alcanzan órganos diana donde se amplifica masivamente la carga viral para dar una viremia secundaria y alcanzar la piel donde, por diferentes mecanismos, se producen las lesiones características de los diversos exantemas. En el caso de las arbovirosis (dengue, chikungunya, zika), la entrada se produce directamente al torrente sanguíneo a través de la picadura de un insecto. Finalmente, en la mayoría de los casos, el virus se excreta por diferentes vías (respiratoria, mucosa, fecal, urinaria) desde las que se puede propagar a otras personas. Esta excreción es más o menos prolongada dependiendo de cada virus y de cada vía. Finalmente, los herpesvirus linfotropos (citomegalovirus [CMV], virus Epstein-Barr [VEB], VHH-6) no suelen eliminarse tras la infección primaria, quedando en estado de latencia y pudiendo protagonizar episodios de reactivación con mayor o menor frecuencia a lo largo de la vida.

Según este esquema, la demostración de la presencia de un virus en una muestra de lesión cutánea o líquido vesicular siempre indicará una relación causal con el exantema, al igual que la demostración de viremia, excepto en el caso de herpesvirus linfotropos en los que, si el método de detección es suficientemente sensible, podría detectarse virus latente, siendo la serología la única forma de dirimir si se trata de una infección primaria o no. Finalmente, el valor diagnóstico de la detección del virus en una vía de excreción (heces, exudado faríngeo, orina) es elevado para muchos de los virus exantemáticos, aunque se ve igualmente comprometido en el caso de los herpesvirus linfotropos y de algunos EV que circulan masivamente en la comunidad durante los períodos epidémicos excretándose sin producir síntomas, por lo que el significado de un resultado positivo variará dependiendo del contexto epidemiológico.

En el momento de producirse el exantema los virus suelen ser detectables en torrente sanguíneo por un corto intervalo de tiempo, con excepción del EB19, para el que puede prolongarse varias semanas. El comienzo de la presencia de los virus en las vías de excreción suele coincidir con el final de la viremia y persiste en exudado faríngeo (durante días), en orina (alguna semana) o en heces (varias semanas en el caso de los EV).

Como norma general, ante un cuadro de exantema se aconseja tomar suero, exudado faríngeo y orina lo antes posible²⁹. En general, el rendimiento de las técnicas directas suele reducirse después de los primeros 7 días, excepto en el caso del EB19 en sangre y los EV en heces, y en todo caso siempre se ve complementado por la detección de anticuerpos³⁰. En el caso de los exantemas vesiculares, los exudados de las lesiones frescas suelen contener alta concentración de virus y proporcionan un elevado rendimiento diagnóstico. La detección directa del virus requiere la preservación de su capacidad infectiva y/o de su genoma durante el transporte de la muestra al laboratorio, que debe ser rápido y manteniendo la cadena de frío. Para algunos virus como el VS o el de la rubéola (VR), que son muy lábiles, esto es particularmente crítico.

Hay 3 posibles estrategias para revelar la presencia de un virus exantemático en una muestra clínica: demostrar su capacidad de infectar un cultivo celular (aislamiento viral); a través de su reactividad con anticuerpos específicos marcados (detección de antígenos virales), o mediante la amplificación y detección posterior de un fragmento de su genoma (amplificación genómica). En la tabla 2 se presentan los métodos de diagnóstico directo de virus exantemáticos. La observación directa del virus en la muestra por microscopía electrónica es un método clásico que durante mucho tiempo fue la base del diagnóstico diferencial rápido de viruela y varicela a través del examen directo del líquido vesicular. Una vez erradicada la viruela ha quedado en desuso excepto cuando hay sospecha de exantemas vesiculares causados por otros poxvirus (monkeypox, cowpox, etc.).

El aislamiento de virus es la técnica más clásica en el diagnóstico etiológico directo de exantemas virales. Se basa en la inoculación de

la muestra en una batería de líneas celulares de cultivo que abarquen el espectro de posibles agentes causantes del cuadro. Para el caso de VS y VR, la OMS recomienda el uso de la línea celular Vero/h-SLAM, línea modificada genéticamente para expresar en su membrana el receptor del VS, manteniendo la permisividad para el VR²⁹. El CMV suele aislarse en fibroblastos de pulmón (MRC5, WI-38)³¹, mientras que para el cultivo de EV ha de recurrirse a una batería más variada si se pretende cubrir todo el espectro de tipos³². Algunos VCoX no crecen en cultivo celular, al igual que el VEB y el VHH-6, por lo que el aislamiento no es una técnica factible. Finalmente los VD, zika (VZik) y chikungunya (VChik) requieren instalaciones de nivel de bioseguridad 3 para su cultivo.

El VS, los EV o el CMV producen un efecto citopático muy claro y característico; en todo caso, la identificación habrá de confirmarse por detección de antígenos por inmunofluorescencia (IF). En algunos casos (como CMV, VVZ o VS), el tiempo necesario para observar el efecto citopático puede prolongarse, e incluso es necesario hacer subcultivos antes de emitir un resultado negativo. Esto se puede evitar haciendo IF en las células a los 2 días de la inoculación, mediante *shell-vial*³¹. También puede hacerse directamente sobre células de sedimento urinario (VS), respiratorias (adenovirus [ADV], EV) o leucocitos (CMV) para detectar antígenos por IF, que durante mucho tiempo ha sido la mejor alternativa para el diagnóstico rápido de estas enfermedades, antes de la aparición de las técnicas de amplificación genómica³³.

Para la detección de los ácidos nucleicos de los virus por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en primer lugar hay que liberar y poner en solución los ácidos nucleicos (extracción) empleando métodos que permitan obtener ácidos nucleicos totales, ya que hay virus exantemáticos tanto con ADN (EB19, ADV, herpesvirus) como con ARN (VS, VR, EV, VD, VZik, VChik). Este proceso puede ser automatizado mediante el uso de robots extractores, disponibles comercialmente. A continuación se realiza la reacción de amplificación; con un paso previo de retrotranscripción (RT) si se van a ensayar virus ARN, lo cual puede hacerse en un solo paso mediante el uso de reactivos comerciales de RT-PCR acoplada. Finalmente se detectan los amplificados por electroforesis en gel de agarosa o por hibridación en microplaca. Para obtener una sensibilidad adecuada puede ser necesario recurrir a una reacción adicional de amplificación (PCR anidada o *nested* PCR). En las técnicas de PCR a tiempo real (PCR-tr) la producción de productos de amplificación viene acoplada a la generación de una señal de fluorescencia, que se monitoriza en tiempo real con excelente sensibilidad, evitando el uso de PCR anidada y la manipulación de los productos de amplificación. Además son potencialmente cuantitativas, aunque este aspecto no es de especial interés en el diagnóstico de los exantemas virales. Las técnicas de PCR-tr son rápidas, sencillas y fácilmente automatizables. En consecuencia son las que se han impuesto actualmente, ya que además ofrecen mayor sensibilidad que el aislamiento y la detección de antígenos³³, alargando el intervalo de tiempo durante el cual los virus son detectables en las muestras. La oferta comercial de ensayos de PCR-tr todavía es escasa para los virus exantemáticos más importantes, pero está en clara expansión y hay disponibles protocolos para los agentes más importantes³⁴⁻³⁸. Finalmente, la PCR permite diseños múltiples en los que se pueden ensayar varios agentes de manera simultánea generando fragmentos de amplificación de tamaños lo suficientemente diferentes como para diferenciarlos por electroforesis³⁹. Hay métodos disponibles para detección simultánea de VS, VR y EB19³⁹, o de EV y VVZ⁴⁰. La PCR-tr permite también esta posibilidad empleando sondas marcadas con diferentes fluoróforos, por lo que actualmente hay un activo desarrollo de técnicas múltiples de PCR-tr⁴¹⁻⁴³ de las que en breve habrá disponibilidad comercial y que se consideran el futuro del diagnóstico. En el diseño de las PCR (tanto convencionales como PCR-tr) es fundamental elegir zonas del genoma que permitan identificar todas las especies (p. ej., VHH-6A y VHH-6B) y genotipos existentes de los virus a ensayar, relacionados con los cuadros clíni-

cos, para lo cual es necesario asegurar que el diseño sigue siendo vigente conforme las cepas de los virus van evolucionando o adaptando a medida que aparecen nuevos genotipos.

Diagnóstico serológico

Es una aproximación alternativa y complementaria a los métodos directos. A los pocos días del comienzo de la enfermedad se empieza a producir la respuesta específica de anticuerpos, que en un primer momento es del tipo IgM (que dura alrededor de 2-3 meses), y que va seguida de la respuesta IgG, que alcanza el máximo a los 15-20 días, y que son de larga duración. Así, la detección de IgM es el método más adecuado para hacer el diagnóstico. Sin embargo, si la muestra está tomada cerca del comienzo de los síntomas, puede no ser detectable; por lo que se precisa de una muestra de seguimiento, tomada 10 días después para confirmar la infección mediante seroconversión de IgG o de anticuerpos totales. Los métodos en fase sólida permiten detectar anticuerpos específicos del isotipo IgM (para diagnóstico de infección reciente), o IgG (para determinar inmunidad o seroconversión), en tanto que las técnicas que miden anticuerpos totales son útiles fundamentalmente para confirmar la seroconversión. En la tabla 2 se relacionan los virus exantemáticos para cuyo diagnóstico son de aplicación los métodos serológicos.

Entre las enfermedades exantemáticas, se reconoce la utilidad de la detección de IgM en el diagnóstico de VS, VR, EB19, CMV, VEB y los arbovirus VD, VZik y VChik⁴⁴ (tabla 2). En general, la respuesta IgM es detectable entre los 3-5 días desde la aparición del exantema, aunque excepcionalmente se puede retrasar (tal es el caso de crisis aplásicas transitorias por EB19); de esta manera, el criterio diagnóstico de elección es la detección de IgM específica en muestra aguda. En el caso de que la primera muestra disponible haya sido tomada en los primeros días, con resultado IgM negativo, y no se disponga de muestra para detección directa, o muestre resultado negativo, se requiere otro suero tomado 7-10 días después, para evidenciar seroconversión de IgM y/o IgG.

Sin embargo, la determinación de IgM no está exenta de problemas, pudiendo obtenerse resultados positivos falsos, por la presencia simultánea de factor reumatoide e IgG específica⁴⁵; por las reacciones cruzadas entre virus, especialmente cuando producen patologías similares (VEB y CMV, por ejemplo)⁴⁶, o por la estimulación policlo-

Tabla 2
Métodos de laboratorio para el diagnóstico de exantemas virales

Virus	Aislamiento	Detección de antígenos	PCR	Serología
Sarampión	+	NA	+++	+++
Rubéola	+	NA	+++	+++
Erythrovirus B19	NA	NA	+++	+++
Enterovirus	+ /+++	+	+++	+
Herpes humano 6	NA	NA	+++	++
Varicela-zóster	+	+	+++	++
Herpes simple	+	+	+++	++
Epstein-Barr	NA	NA	+++	+++
CMV	+	++	+++	+++
Dengue	NA	+++	+++	++
Zika	NA	NA	+++	++
Chikungunya	NA	NA	+++	+++

NA: no aplicable.

nal de linfocitos de memoria que origina respuesta IgM en pacientes que son IgG positivos, en ausencia de infección reciente⁴⁷. Por otra parte, hay presencia de IgM tanto en infección primaria como en secundaria y su discriminación es importante. Igualmente, infecciones recientes pueden cursar sin desarrollo de IgM: como las infecciones en inmunodeprimidos. Por último, hay situaciones de persistencia de IgM durante prolongados intervalos de tiempo que pueden dificultar el diagnóstico. Todas estas circunstancias son problemáticas cuando se plantea hacer el diagnóstico diferencial de enfermedad exantemática (rubéola, sarampión y EB19⁴⁸) y se requieren métodos confirmatorios. Los ensayos de avidez de IgG permiten confirmar la infección primaria. Son de aplicación para caracterizar casos de sarampión con fallo vacunal⁴⁹ y para confirmar los casos de infección primaria por rubéola, especialmente en el embarazo⁵⁰, en el contexto del Plan de Eliminación de estas enfermedades, así como para la caracterización de casos por VEB⁵¹ y CMV⁵². El establecimiento de perfiles de anticuerpos frente al VEB permite confirmar la infección por este virus en presencia de reactividad frente a otros herpesvirus. La cuantificación de anticuerpos totales o de IgG en muestra aguda permite establecer con alta probabilidad una infección secundaria (caso del zóster). El establecimiento de la ratio IgM/IgG permite diferenciar la infección primaria y secundaria por VD. Por último, hay circunstancias en las que la caracterización serológica específica solo se puede hacer de forma definitiva mediante neutralización (VD y VZik, EV y ADV).

Enfermedades exantemáticas virales: caracterización molecular

La caracterización genética de los virus exantemáticos es de especial trascendencia en los casos de sarampión y rubéola por tratarse de enfermedades en proceso de eliminación. La caracterización genética de otros virus exantemáticos será más relevante conforme se progresa en la eliminación del sarampión y la rubéola para mejorar los procesos de vigilancia.

La caracterización genética de los virus es una herramienta fundamental en la vigilancia del sarampión y la rubéola. Resulta indispensable para diagnosticar con certeza los casos posvacunales; trazar los patrones de circulación de las cepas; identificar el origen importado o autóctono de un caso, y describir la ausencia de circulación endémica para documentar la eliminación en una región determinada. Estas técnicas se basan en la amplificación mediante RT-PCR, secuenciación y posterior análisis filogenético de regiones variables del genoma de estos virus. El genotipado solo puede realizarse sobre muestras en las que se haya detectado el virus por aislamiento o RT-PCR.

Nomenclatura asignada por la Organización Mundial de la Salud

La nomenclatura se ha uniformizado con el fin de armonizar la que se utiliza para todos los componentes de la vacuna triple viral (p. ej., MVs/Madrid.ESP/24.15/)⁵³.

Genotipado de los casos

En el VS, la región mínima para asignar genotipo son los 450 nucleótidos (nt) que codifican el extremo carboxilo de la nucleoproteína (N-450). Además de esta, se debe utilizar al menos la secuencia de la región codificante completa del gen *H*, para la descripción de un nuevo genotipo. Así, se han definido 24 genotipos (A, B1-B3, C1, C2, D1-D11, E, F, G1-G3, H1 y H2), pertenecientes a 8 grupos filogenéticos (A-H), con una secuencia de referencia para cada uno^{53,54}. No todos los genotipos se encuentran en circulación en la actualidad, siendo relevantes en Europa los genotipos D8 y B3.

En el caso de VR, el genotipado se basa en una secuencia de 739 nt (del nt 8731 al nt 9469) de la región codificante del gen *E1*. Además, para describir un nuevo genotipo se necesita la secuencia com-

pleta de la región del genoma que codifica las proteínas estructurales (3192 nt) de 2 cepas de referencia para cada genotipo. Así se han definido 12 genotipos (1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 2A, 2B, 2C) y uno provisional (1a), pertenecientes a 2 grupos filogenéticos⁵⁵. En la actualidad en Europa circula fundamentalmente el genotipo 2B.

Para llevar a cabo el genotipado se realiza un análisis filogenético en el que se incluye la secuencia problema y las secuencias de referencia referidas anteriormente, recomendadas por la OMS para cada virus.

Bases de datos MeaNS y RubeNS

En 2008, la red de laboratorios de referencia para sarampión y rubéola de la OMS creó la base de datos Measles Nucleotide Surveillance (MeaNS)⁵⁶, principalmente de secuencias N-450, enviadas por los laboratorios de la red. Además incluye la información necesaria para obtener el nombre asignado por la OMS y datos epidemiológicos adicionales. MeaNS proporciona además herramientas para el genotipado y la comparación de secuencias. Existe una base de datos similar para la rubéola denominada RubeNS⁵⁵, aunque la disponibilidad de secuencias es menor y el uso en tiempo real muy escaso actualmente. Compartir lo antes posible la información genética de las cepas que circulan a través de estas bases de datos constituye una herramienta fundamental para la vigilancia del sarampión y la rubéola.

Nuevas herramientas de caracterización molecular al servicio de la vigilancia epidemiológica del sarampión y la rubéola

En la actualidad el genotipado es un método valioso pero insuficiente para la vigilancia. En el caso del sarampión, en los últimos años se han producido grandes brotes por un mismo genotipo, sin que este dato por sí solo permita establecer los patrones de circulación del virus. Sin embargo, MeaNS permite un estudio más detallado de las secuencias N-450 del mismo genotipo, discriminando unas de otras y aportando más información. El conjunto de secuencias idénticas de un mismo genotipo se denomina *haplotipo* y se designa con el nombre de la más antigua. Cuando un haplotipo ha sufrido una amplia distribución, tanto temporal como geográfica, es reconocido por MeaNS con rango de variante de secuencia o *named strain*⁵⁴. Desde la OMS se insta a los laboratorios de referencia a identificar las variantes de los casos que se producen en su país y aportar estos datos, así como el nombre de la OMS de cada caso y la identificación de la muestra en MeaNS, a través de informes anuales. En España esta metodología ya está disponible para la vigilancia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Instituto de Salud Carlos III. Plan de Eliminación del Sarampión en España, 2000. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=19/10/2012-f2327d5909>
2. Griffin DE. Measles Virus. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Vol 2. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins; 2013. p. 1042-69.
3. Marcdante K, Kliegman R, Jenson H, Behrman R. Infecciones relacionadas con exantemas. En: Nelson Pediatría Esencial. 6.ª ed. Barcelona: Elsevier Saunders; 2011. p. 367.
4. World Health Organization. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region Strategic Plan 2005-2010. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2005.
5. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. Madrid, 2013.
6. Masa J, López N, De Viarce M. Vigilancia epidemiológica en España del sarampión, la rubéola y el síndrome de rubéola congénita. *Rev Esp Salud Pública*. 2015;89: 365-79.

7. World Health Organization. Measles. Fact sheet [updated July 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>
8. 4th Meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC). Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2016. Disponible en: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/304958/4th-RVC-meeting-report.pdf
9. Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión y de la Rubéola. Informe anual 2011. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/Informe-Anual-Plan-Eliminacion-Sarampion-Rubeola-2011.pdf>
10. Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión y de la Rubéola. Informe anual 2012. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/Informe-Sarampion_Rubeola-y-SRC-Espana-2012.pdf
11. Centro Nacional de Epidemiología. Plan Nacional de Eliminación del Sarampión y de la Rubéola. Informe anual 2015. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-enfermedades-prevenibles-vacunacion/pdf_2016/Vigilancia_SAR_RUB_2015web.pdf
12. Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis.* 2004;189 Suppl 1:S4-16.
13. Atkinson W, Wolfe C, Hamborsky J, editors. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (The Pink Book)*. 12th ed. Washington DC: The Public Health Foundation; 2011.
14. Moulin E, Beal V, Jeantet D, Horvat B, Wild TF, Waku-Kouomou D. Molecular characterization of measles virus strains causing subacute sclerosing panencephalitis in France in 1977 and 2007. *J Med Virol.* 2011;83:1614-23.
15. Lambert N, Strebel P, Orenstein W, Icenogle J, Poland GA. Rubella. *Lancet.* 2015;385:2297-307.
16. Muscat M, Ben Mamou M, Shefer A, Jankovic D, Deshevoy S, Butler R. The state of measles and rubella in the WHO European region. *Rev Esp Salud Publica.* 2015;89:345-51.
17. Lazar M, Abernathy E, Chen MH, Icenogle J, Janta D, Stanescu A, et al. Epidemiological and molecular investigation of a rubella outbreak, Romania, 2011 to 2012. *Euro Surveill.* 2016;21:30345.
18. Cherry JD. Rubella virus. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL, editors. *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 2271-99.
19. Salvia MD, Álvarez E, Bosch J, Goncé A. Infecciones congénitas. *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología*. Barcelona: Asociación Española de Pediatría; 2008.
20. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30:43-113.
21. Vargas-Díez E, Buezo GF, Aragües M, Daudén E, De Ory F. Papular purpuric gloves and socks syndrome. *Int J Dermatol.* 1996;35:626-32.
22. Agut H, Bonnafous P, Gautheret-Dejean A. Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:313-35.
23. Gershon AA, Gershon MD. Pathogenesis and Current Approaches to Control of Varicella-Zoster Virus Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:728-43.
24. Nardone A, De Ory F, Carton M, Cohen D, Van Damme P, Davidkin I, et al. The comparative sero-epidemiology of varicella zoster virus in 11 countries in the European region. *Vaccine.* 2007;25:7866-72.
25. Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. MSSSI. Calendario común de vacunación infantil recomendado para 2016. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/proteccionSalud/vacunaciones/docs/CalendarioVacunacion2016.pdf>
26. Gnann JW Jr. Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *J Infect Dis.* 2002;186 Suppl 1:S91-8.
27. Dworkin RH, Johnson RW, Breuer J, Gnann JW, Levin MJ, Backonja M, et al. Recommendations for the management of herpes zoster. *Clin Infect Dis.* 2007;44 Suppl 1: S1-26.
28. Aswathyrj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, Hober D. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy. *Med Microbiol Immunol.* 2016;205:397-407.
29. Organización Mundial de la Salud. Manual para el diagnóstico de laboratorio de la infección por los virus del sarampión y de la rubéola. 2.ª ed. 2007. Disponible en: http://www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_sp.pdf
30. Mosquera MM, De Ory F, Gallardo V, Cuenca L, Morales M, Sánchez-Yedra W, et al. Evaluation of diagnostic markers for measles virus infection in the context of an outbreak in Spain. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5117-21.
31. Gimeno Cardona C, Navarro Ortega D, De Oña Navarro M, Pérez Sáenz JL. Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Herpesvirus. 8a. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC; 2005.
32. Prats G, Codina MG, Cueto M, Echevarría JE, Vicente D. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. 36. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: SEIMC; 2010.
33. Chua KY, Thapa K, Yapa CM, Somerville LK, Chen SC, Dwyer DE, et al. What assay is optimal for the diagnosis of measles virus infection? An evaluation of the performance of a measles virus real-time reverse transcriptase PCR using the Cepheid SmartCycler® and antigen detection by immunofluorescence. *J Clin Virol.* 2015;70:46-52.
34. Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, et al. Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcriptase PCR. *J Med Microbiol.* 2009;58:638-43.
35. Pillet S, Billaud G, Omar S, Lina B, Pozzetto B, Schuffenecker I. Multicenter evaluation of the Enterovirus R-gene real-time RT-PCR assay for the detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 1:S11-14.
36. Takano T, Yamada K. Quantitation of human parvovirus B19 DNA by real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Int.* 2007;49:459-62.
37. Thomas B, Beard S, Jin L, Brown KE, Brown DW. Development and evaluation of a real-time PCR assay for rapid identification and semi-quantitation of measles virus. *J Med Virol.* 2007;79:1587-92.
38. Zhao LH, Ma YY, Wang H, Zhao SP, Zhao WM, Li H, et al. Establishment and application of a TaqMan real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assay for rubella virus RNA. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2006;38:731-6.
39. Mosquera MM, De Ory F, Moreno M, Echevarría JE. Simultaneous detection of measles virus, rubella virus, and parvovirus B19 by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:111-6. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2002;40:1574.
40. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol.* 1999;57:145-51.
41. Hübschen JM, Kremer JR, De Landtsheer S, Muller CP. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. *J Virol Methods.* 2008;149:246-50.
42. Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P, et al. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. *J Virol Methods.* 2009;162:1-7.
43. Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, et al. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *Microbiol Immunol.* 2009;53:22-9.
44. Landry ML. Immunoglobulin M for Acute Infection: True or False? *Clin Vaccine Immunol.* 2016;23:540-5.
45. Meurman OH, Ziola BR. IgM-class rheumatoid factor interference in the solid-phase radioimmunoassay of rubella-specific IgM antibodies. *J Clin Pathol.* 1978; 31:483-7.
46. Kinno R, Kurokawa S, Uchiyama M, Sakae Y, Kasai H, Ogata H, et al. False-positive results obtained for immunoglobulin M antibody tests of cerebrospinal fluid for herpes simplex virus in a patient with varicella zoster virus encephalitis. *Intern Med.* 2015;54:2667-70.
47. Sakiani S, Koh C, Heller T. Understanding the presence of false positive antibodies in acute hepatitis. *J Infect Dis.* 2014;10:1886-9.
48. Thomas HJ, Barrett E, Hesketh LM, Wynne A, Morgan-Capner P. Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J Clin Virol.* 1999;14:107-18.
49. Mercader S, García P, Bellini WJ. Measles virus IgG avidity assay for use in classification of measles vaccine failure in measles elimination settings. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:1810-7.
50. Tipples GA. Rubella diagnostic issues in Canada. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 2: S659-63.
51. De Ory F, Antonaya J, Fernández MV, Echevarría JM. Application of low avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1669-71.
52. Guisasaola ME, Ramos B, Sanz JC, García-Bermejo I, De Ory Manchón F. Comparison of IgG avidity assays in the confirmation of the diagnosis of cytomegalovirus primary infection. *APMIS.* 2010;118:991-3.
53. World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012;87:73-80.
54. World Health Organization. Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90:373-80.
55. World Health Organization. Rubella virus nomenclature update: 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013;88:337-48.
56. Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, et al. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 1:S514-23.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Detección de infecciones de transmisión sexual por técnicas de biología molecular

Christian Sabater Cabrera^a, Mercedes Rodríguez Pérez^a, Fernando Vázquez^{a,b,c,*} y Luis Otero Guerra^d

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España

^bDepartamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^cInstituto Oftalmológico Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, España

^dServicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón, España

RESUMEN

Palabras clave:

Biología molecular

Infecciones de transmisión sexual

Cribado de infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual precisan para su control de pruebas diagnósticas rápidas, fiables y que permitan su realización en situaciones de cribado. Las técnicas de biología molecular han supuesto una verdadera revolución diagnóstica. Debido a su elevada sensibilidad, no solo detectan más infecciones, sino que permiten la obtención de muestras poco invasivas que facilitan los programas de cribado y evitan el rechazo de los pacientes a la realización de toma de muestras. La mejora de su especificidad evita en muchos casos la realización de pruebas de confirmación, bajo la premisa del cumplimiento de normas de calidad. También permiten diagnosticar patógenos que las técnicas de cultivo son incapaces de recuperar, y cada vez tenemos plataformas diagnósticas más sencillas, versátiles y en formato múltiple que agilizan el trabajo en el laboratorio e incluso fuera de él.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Detection of sexually transmitted infections using molecular biology techniques

ABSTRACT

Keywords:

Molecular biology

Sexually transmitted infections

Screening assay

Sexually transmitted infections (STI) require rapid, reliable diagnostic tests that can be performed in screening situations. Molecular biology techniques have been a true diagnostic revolution. Due to their high sensitivity, they detect more infections and allow non-invasive sample collection, simplifying screening programs and minimising patient refusal to have samples taken. Improvements in specificity have reduced the need for confirmation tests in many cases, under the premise of compliance with quality standards. They also allow to identify pathogens that culture techniques are unable to recover. Moreover, diagnostic platforms are increasingly simple, versatile and available in multiplex format, facilitating work inside and outside the laboratory.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fvazquez@uniovi.es (F. Vazquez)

Introducción

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) suponen a escala global una importante carga de morbilidad y mortalidad. En España se viene asistiendo a un aumento en su incidencia, probablemente debido a la relajación por parte de la población en el uso de medidas de prevención como consecuencia de la pérdida de miedo a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Un pilar muy importante en la lucha contra estas infecciones lo constituyen las pruebas diagnósticas que permiten un abordaje terapéutico etiológico. No obstante, el diagnóstico de las ITS siempre ha sido difícil. Las principales bacterias productoras de ITS o no son cultivables —como ocurre con *Treponema pallidum*— o lo son en cultivos celulares de elevada dificultad técnica y baja sensibilidad, como en el caso de *Chlamydia trachomatis*, o solo se han conseguido en centros muy especializados como *Mycoplasma genitalium*. Otro patógeno de gran relevancia, como *Neisseria gonorrhoeae*, es muy sensible a las condiciones ambientales adversas y su cultivo ofrece falsos negativos. Para complicar aún más las cosas, algunos microorganismos como *Ureaplasma urealyticum* o *Mycoplasma hominis* desempeñan un papel dudoso como productores de enfermedad, recuperándose tanto de pacientes enfermos como sanos. En un porcentaje importante de casos, nunca se conseguía encontrar la etiología del cuadro clínico.

En los últimos años, el uso de las técnicas de biología molecular (TBM) —en especial las basadas en amplificación de ácidos nucleicos (AAN)— han cambiado el diagnóstico de las ITS y las infecciones genitales. Son innumerables las ventajas que aportan, como su elevada sensibilidad y especificidad; permitir usar muestras no invasivas y muestras tomadas por el propio paciente; detectar bajas concentraciones de microorganismos viables o no; poder hacer mejores cribados poblacionales y en muestras extragenitales; la incorporación del diagnóstico de patógenos de difícil o imposible cultivo; la tipificación de microorganismos, o la posibilidad de detectar algunos genes de resistencia¹. Sin embargo, también hay problemas, como la posibilidad de falsos positivos por contaminación; su elevado coste; el empleo de equipos sofisticados, y —aunque parezca una paradoja— el desplazamiento y supresión de técnicas clásicas como el cultivo, que permite la realización de pruebas fenotípicas de susceptibilidad, imprescindibles para orientar el tratamiento de patógenos multirresistentes, como ocurre en el caso del gonococo.

Por todo ello, los laboratorios han de tener estrictos controles de calidad, acreditaciones internacionales como la ISO o Joint Commission, y conocer aspectos como la prevalencia en la población de estos patógenos, ya que poblaciones con baja prevalencia comprometen el valor predictivo.

Respecto a las técnicas disponibles, hemos pasado de las técnicas de hibridación a la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional, y con posterioridad a otras más modernas como la PCR en tiempo real, la PCR múltiple o sistemas más fáciles de realizar como la amplificación isotérmica mediada por bucle (*loop-mediated isothermal amplification* [LAMP]).

En este trabajo se revisa el uso y aportación de las técnicas de biología molecular al diagnóstico de las ITS, de las que se han excluido el VIH y los virus de las hepatitis que precisan de revisiones específicas.

Infección gonocócica

La infección gonocócica continúa siendo una causa importante de infecciones supuradas, aunque también produce infecciones asintomáticas (especialmente en mujeres). El diagnóstico clásico se realiza mediante el cultivo, que tiene la ventaja de su bajo coste y permite la realización de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se está reemplazando por las técnicas de detección de AAN que son más sensibles, pero cuyo valor predictivo positivo puede ser bajo en poblaciones de baja prevalencia. Ofrecen importantes ventajas frente al

cultivo, como no precisar organismos viables, por lo que las condiciones de transporte y conservación de la muestra son menos estrictas. Su elevada sensibilidad permite su uso tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos, y en muestras no invasivas como la orina de primer chorro del varón o el exudado vaginal. La sensibilidad de la orina en mujeres es menor y no se considera una muestra óptima². Son la prueba de elección en muestras extragenitales de recto y faringe, aunque, debido a los falsos positivos, se recomienda la confirmación con otra técnica frente a una diana diferente². Se han validado varias técnicas dirigidas frente a *N. gonorrhoeae*, solo o asociado a otros patógenos como *C. trachomatis*^{3,4} o en formato múltiple mediante *microarrays*⁵. También se ha desarrollado el sistema LAMP, más rápido, para el ORF1 del gen de la glutamino sintetasa de *N. gonorrhoeae*⁶.

La aparición de especies de *N. gonorrhoeae* multirresistentes ha devuelto protagonismo al cultivo, pero mediante TBM que detectan genes de resistencia se están desarrollando métodos de detección de resistencia a penicilina⁷ (gen *porB*), a ciprofloxacino⁸, a azitromicina⁹ y resistencias múltiples a cefalosporinas, azitromicina, ciprofloxacino y espectinomicina¹⁰. También se describen métodos que directamente desde muestras clínicas determinan resistencia a ciprofloxacino¹¹. Idealmente, los métodos de susceptibilidad deberían reflejar la CMI exacta a los antimicrobianos, pero como la aparición de resistencias se ve afectada por varios genes, es difícil que los métodos moleculares reflejen la CMI. En general son útiles para vigilancia epidemiológica, aunque sería interesante que pudiesen utilizarse en muestras clínicas y en situaciones en las que no es posible el cultivo¹². Las TBM también permiten el genotipado¹.

Infección por clamidias

C. trachomatis es la etiología bacteriana de ITS más frecuente. Afecta fundamentalmente a jóvenes, la mayoría de las veces de forma asintomática, por lo que la infección no es reconocida ni tratada y como consecuencia presenta complicaciones: enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), endometritis, salpingitis, infertilidad o embarazo ectópico. Inicialmente, el diagnóstico se realizaba con técnicas de baja sensibilidad como la inmunofluorescencia, el cultivo celular o la determinación antigénica mediante enzoinmunoanálisis, pero desde hace años se dispone de técnicas de AAN que constituyen el estándar diagnóstico por ser muy sensibles y específicas.

Su elevada sensibilidad permite su empleo en muestras muy diversas, como exudados uretrales o cervicales de pacientes sintomáticos, en los que ya se presupone una importante carga bacteriana, pero también en muestras no invasivas en pacientes asintomáticos, lo que las convierte en una herramienta indispensable en los programas de cribado poblacional¹³. En mujeres la muestra de elección es el exudado vulvovaginal —tanto obtenido por un facultativo como por la propia paciente— que es más sensible incluso que el exudado cervical obtenido mediante espéculo¹⁴. El primer chorro de orina en varones es una muestra tan sensible o incluso mejor que el exudado uretral, con las evidentes ventajas de aceptabilidad por parte del paciente. La muestra debe obtenerse habiendo dejado pasar como mínimo 1 h desde la última micción. La orina no es aceptable en mujeres. Las AAN también son de elección en localizaciones extragenitales. En el caso de muestras rectales, la toma puede tanto ser ciega como mediante proctoscopia, aunque no todas las técnicas comerciales presentan las mismas sensibilidades¹⁵. El problema derivado de la pérdida de sensibilidad (falsos negativos) de algunas técnicas —debido a la incapacidad para detectar la “nueva variante” de *Chlamydia* que presenta una delección en el plásmido diana— ya ha sido solventado por todas ellas mediante la modificación de la diana diagnóstica.

La especificidad de las AAN también es excelente, por lo que en poblaciones de riesgo no es necesario confirmar los resultados positivos con otra técnica frente a otra diana. Solo estaría indicado en casos con implicaciones legales y hay debate acerca de su convenien-

cia en muestras extragenitales. Así, mientras la guía británica no se muestra partidaria¹⁵, sí se aconseja en la guía de los Centers for Disease Control and Prevention¹⁶.

Las TBM también permiten conocer la serovariedad, de interés epidemiológico y especialmente para detectar las serovariedades L, responsables del linfogranuloma venéreo (LGV). Las serovariedades se pueden determinar mediante el análisis PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción) del gen *omp1* o mediante secuenciación¹.

Linfogranuloma venéreo

Producido por *C. trachomatis* serovariedad L1, L2a, L2b y L3. Desde su reemergencia en Europa durante la pasada década, el LGV se ha convertido en endémico en la población de hombres que tienen sexo con otros hombres, y se asocia fuertemente a individuos infectados por el VIH. Cuando la adquisición es genital, suele causar clínica ulcerativa en el lugar de entrada y días o semanas después y, debido a su carácter linfotrópico, adenopatías inguinales. Si la adquisición es rectal, produce un síndrome anorrectal, habitualmente sin adenopatías demostrables a la exploración por no estar accesibles. Existe la infección rectal asintomática.

Son muestras aceptables los exudados de la base de las úlceras, aspirados ganglionares, exudados rectales, faríngeos, uretrales e incluso el primer chorro de orina si se sospecha afectación genital¹⁷.

Para el diagnóstico, los métodos clásicos de cultivo y serología han sido sustituidos por las más sensibles técnicas de AAN, ya que todas las comercializadas para *Chlamydia* detectan las serovariedades del LGV, aunque sin poder diferenciarlas del resto. Realizado este primer paso, las muestras positivas para *Chlamydia* deben estudiarse para determinar si pertenecen a la serovariedad L, lo que habitualmente se realiza en centros de referencia. Existen varias posibilidades, bien mediante amplificación con PCR caseras del gen *omp1* o el *CrP*, seguido de técnicas de tipificación mediante RFLP o mediante secuenciación.

Infecciones por micoplasmas

El papel de los micoplasmas como etiología de ITS siempre se ha discutido debido a su papel comensal en muchos individuos. Además, la principal herramienta diagnóstica era el cultivo y presentaba muchas limitaciones, por lo que la aparición de las técnicas de biología molecular ha supuesto una auténtica revolución. Permiten diferenciar *U. urealyticum* en 2 especies distintas: por un lado *U. parvum* (no implicado en patología), y por otro lado *U. urealyticum* propiamente dicho, responsable de casos de uretritis¹⁸. Aun así, se sigue encontrando *U. urealyticum* en pacientes asintomáticos y la carga bacteriana tiene elevado valor predictivo con la producción de uretritis¹⁹. *M. hominis* también se recupera en el 20-50% de las mujeres asintomáticas sexualmente activas, aunque su papel patógeno está claramente establecido en la vaginosis bacteriana y, con menor fuerza, en casos de endometritis y EIP. Se han comercializado técnicas de PCR en tiempo real que determinan la presencia de *M. hominis*, diferencian las 2 especies de *Ureaplasma* y también son capaces de determinar la presencia de una tercera especie de micoplasma implicada en ITS: *M. genitalium*. No existe ninguna duda sobre el papel patogénico de *M. genitalium* como productor de uretritis²⁰, de la que sería la segunda causa más frecuente solo por detrás de *C. trachomatis*. También se ha demostrado su relación con cervicitis y EIP²¹. El cultivo de *M. genitalium* es muy lento (meses), poco sensible y solo ha podido cultivarse en laboratorios de referencia muy especializados, por lo que a efectos prácticos su presencia solo se puede demostrar mediante técnicas de AAN, que generalmente se basan en la detección del gen de la adhesina *MgPa*. Las muestras apropiadas son las mismas que se emplearían en el caso de *Chlamydia*. La aparición de resistencia a los antimicrobianos (tanto a azitromicina, que se emplea como

primera línea, como a moxifloxacino, que se emplea como segunda línea) constituye un problema. Si fracasan ambos tratamientos, las opciones son doxiciclina o pristinamicina²². Se han descrito técnicas de PCR en tiempo real que estudian la presencia de mutaciones en el gen *rRNA 23S* que determinan resistencia a azitromicina²³ y al gen *ParC* para moxifloxacino²⁴.

Sífilis

El estudio molecular de la sífilis se está implantando cada vez más como un método de diagnóstico en los laboratorios de microbiología y las nuevas guías incluyen este marcador en sus recomendaciones²⁵. Las técnicas moleculares evitan las limitaciones de otros métodos de detección directa, como la microscopía de campo oscuro y la inmunofluorescencia directa, métodos con baja sensibilidad.

El genoma de *T. pallidum* se ha detectado en úlceras genitales, muestras de tejidos, líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre. Es el método de elección para lesiones orales, donde puede haber contaminación con treponemas comensales.

Se han desarrollado distintos métodos de detección de *T. pallidum* basados en amplificación genómica o PCR (simple, anidada, en tiempo real), utilizando como diana distintos genes que codifican lipoproteínas (*bmp*, *tpa47*, *tpaA* o 4D) o genes como *poA*²⁶. Varios estudios muestran concordancia en los resultados²⁷. La PCR de *T. pallidum* presenta una mayor sensibilidad que la microscopía de campo oscuro en el estudio de úlceras genitales en la sífilis primaria²⁸.

La biología molecular también se usa con fines epidemiológicos y se han descrito técnicas basadas en la amplificación y posterior RFLP de los genes *arp* y *tpa*²⁹, como también técnicas de secuenciación. Sin embargo, la capacidad de discriminación es baja, ya que el subtipo 14d predomina en Europa y en muchas partes del mundo²⁵.

Donovanosis o granuloma inguinal

Las TBM se han desarrollado poco en esta infección, excepto para estudios de caracterización del agente causal y su relación con el género *Klebsiella*. Se ha desarrollado un sistema de captura de oligonucleótidos del gen *phoE* de *Klebsiella* con detección colorimétrica³⁰.

Chancroide

Las TBM tienen una sensibilidad del 95%³¹, y actualmente se han diseñado métodos moleculares comerciales en formato múltiple para detección en úlceras que incluye, entre otros patógenos, la sífilis y el herpes genital³². Con las TBM se ha puesto de manifiesto la presencia de este patógeno en úlceras cutáneas extragenitales en regiones tropicales y subtropicales, y que se trata de cepas de la clase I que han divergido recientemente³³.

Infecciones por herpes genital

El virus herpes simplex (VHS) es un virus ADN de doble cadena, ubicuo (afecta a todo tipo de poblaciones), responsable de infecciones orolabiales (asociadas principalmente a VHS-1) y genitales (más frecuentes por VHS-2), aunque ambos virus producen los 2 tipos de patología. La transmisión ocurre por contacto directo con lesiones con replicación activa tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos³⁴. Después de la infección primaria, el virus queda en estado de latencia en los ganglios sensoriales y causa reactivaciones en el huésped, siendo el VHS-2 el que presenta la tasa de recaída más alta en infección genital. Se puede diagnosticar clínicamente cuando las lesiones presentan el patrón de vesículas que evolucionan a úlceras y finalmente costras que curan espontáneamente. Pero en presentaciones atípicas, complicaciones extragenitales, para diferenciarla de otras lesiones ulcerativas, y para genotipar el virus, es necesario el diagnóstico microbiológico. Clásicamente, al ser lesiones con alta

carga viral, el cultivo celular ha sido el “patrón oro”. No obstante, en los últimos años se ha demostrado que las técnicas genómicas aumentan la sensibilidad³⁵ entre un 11 y un 71%, son útiles en todo tipo de muestras (exudados, lesiones, LCR, sangre, humor vítreo) y permiten detectar infecciones subclínicas y con baja carga viral.

Las técnicas moleculares utilizan como dianas secuencias conservadas de genes que codifican proteínas para ADN polimerasa y timidina-cinasa (comunes a VHS-1 y VHS-2), o glucoproteínas de superficie (gG, gD, gI) que permiten discernir entre los 2 tipos de VHS.

Al principio se propusieron varios procedimientos moleculares basados en la detección del genoma por hibridación, y PCR anidadas³⁶, pensadas principalmente para detectar bajas cargas virales. En la actualidad se han sustituido por métodos de mayor rapidez, menor coste económico, menor complejidad intralaboratorio y menor riesgo de contaminación cruzada, como la PCR en tiempo real, que permiten tanto la detección como la cuantificación del virus. Además se ha comprobado que no hay un descenso de la sensibilidad respecto a la PCR anidada^{1,37} y se detectan 50 copias/ml. Se han desarrollado multitud de protocolos para PCR en tiempo real³⁸ que permiten efectuar en el laboratorio un diagnóstico casero, siempre que se disponga de un control positivo interno que detecte la presencia de inhibidores de amplificación y controle la calidad de la preparación de la muestra, y un control negativo. También están disponibles comercialmente. Hay PCR múltiples de cribado de VHS junto con otras ITS³⁹. Otro uso importante de las técnicas moleculares es la detección de resistencias a los antivirales. En pacientes inmunodeprimidos (VIH, trasplantes de órgano sólido o de células hematopoyéticas), la tasa de resistencias es significativa⁴⁰ (3,5-10%) y ha llegado incluso al 36%⁴¹. Este fenómeno se lleva a cabo por mutaciones en los genes *UL-23* (timidina-cinasa) y *UL-30* (ADN polimerasa), que es donde están los segmentos que servirán de diana molecular, para seguidamente secuenciar los amplicones obtenidos y buscar mutaciones causantes de resistencia.

Tricomoniasis

Aunque en países como Estados Unidos hay zonas con alta prevalencia, en Europa y en España su presencia ha disminuido drásticamente en los últimos años, por lo que algunos estudios⁴² indican que el uso de métodos moleculares, con mayor sensibilidad y especificidad que los métodos convencionales, solo estarían indicados para poblaciones de riesgo con una prevalencia > 2% o en uretritis no gonocócicas persistentes⁴³.

Las TBM fueron en un principio sistemas basados en la hibridación del ADN, como el Affirm VP III (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos) o PCR caseras⁴⁴. Actualmente se dispone de métodos comerciales como la PCR en tiempo real Roche LightCycler (Roche Diagnostics)⁴⁵ o el BD ProbeTec TV Qx Amplified DNA (Becton Dickinson). Cuando se comparan técnicas de AAN con el cultivo, se encuentra que este último solo tiene una sensibilidad del 70%.

El desarrollo de métodos de amplificación como el LAMP ha permitido acercar el diagnóstico a entornos en los que no es posible hacer la PCR convencional. Así, en un estudio reciente con una diana del gen de la actina, esta técnica fue comparable a la PCR convencional y mejor que el cultivo o la PCR múltiple⁴⁶. Otros métodos, como el AmpliVue assay (método de PCR isotérmica dependiente de la helicasa), tienen una sensibilidad del 97,8% y una especificidad del 98,9% cuando se comparan con el Aptima TV⁴⁷. Los paneles de PCR múltiple como Allplex (Seegene) o FilmArray (BioFire) permiten la detección de varios patógenos.

Se están desarrollando nuevos métodos como PCR asimétricas usando cebadores contra el gen *pfoB* que dan menos falsos positivos y que son interesantes para países con pocos recursos⁴⁸.

Un aspecto importante es el origen de la muestra, ya que en mujeres tanto la orina de primer chorro como el exudado vaginal incluso recogido por la propia paciente son válidos; en el varón es conve-

niente recoger, además de la orina, muestras de uretra y semen⁴⁴. El tiempo que se tarda en procesar la muestra desde que se recoge condiciona la sensibilidad de la técnica, incluso para las PCR, y en consecuencia las muestras de orina no deberían permanecer más de 1 h a temperatura ambiente antes de ser procesadas o congeladas⁴⁹.

Para estudios de genotipificación se ha recomendado el uso de técnicas como el RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Estudios recientes usan MLST (*multilocus sequence typing*) con una PCR anillada de muestras directas y encuentran que el genotipo II está más asociado a redes sexuales de alto riesgo⁵⁰.

Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus ADN que representa una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuentes a nivel global y que infecta a todas las razas, sexos y edades. La mayoría de las infecciones genitales por VPH se adquieren por vía sexual y alrededor del 90% son asintomáticas y transitorias al ser eliminadas por el propio sistema inmune del individuo⁵¹. Sin embargo, en otros casos pueden causar desde verrugas o condilomas hasta distintos tipos de neoplasias como la del cuello del útero⁵² (para cuyo desarrollo es necesario el VPH), vagina, ano⁵³, pene⁵⁴ y cáncer orofaríngeo. Además, cada vez hay más hallazgos de ADN de VPH de alto riesgo en cánceres menos habituales⁵⁵. Debido a las graves consecuencias a largo plazo, es necesario un diagnóstico y un seguimiento de estos pacientes.

Debido a la poca rentabilidad del cultivo y de la serología, se han desarrollado numerosos ensayos para detectar VPH mediante detección genómica en distintos tipos de muestras: exudados vaginales, endocervicales, anales, uretrales, faríngeos y biopsias⁵⁶. Estos ensayos se basan en la amplificación de la diana (PCR), amplificación de la señal o amplificación mediante sondas.

La captura de híbridos es un método basado en la hibridación del ADN viral con sondas ARN; estos híbridos se ponen de manifiesto mediante quimioluminiscencia. Se usan 2 cócteles de sondas: uno de ellos frente a 13 genotipos del VPH de alto riesgo y el otro frente a 5 genotipos de bajo riesgo. Esta técnica posee una sensibilidad inferior a la de la PCR.

Los métodos de amplificación genómica permiten la detección del VPH amplificando la región conservada del gen de la proteína mayor de la cápsida (L1) utilizando cebadores consenso (MY11/MY09, GP5+/6+, SPF10). También se han desarrollado técnicas de amplificación genómica con otras dianas dentro del genoma del VPH como el ARNm de los oncogenes virales E6-E7 (PCR en tiempo real), mediante los cuales se puede obtener información del carácter oncogénico del virus y la progresión de la enfermedad.

Hay una amplia gama de técnicas comerciales disponibles de las cuales solo 5 están aprobadas por la Food and Drug Administration (Hybrid Capture 2®, Digene; Cervista HPV HR® y Cervista HPV16/18®, Hologic que se basan en amplificación de la señal; Cobas HPV Test®, Roche Diagnostics y Aptima HPV Assay® Hologic en amplificación de la diana). Aptima HPV es la única validada con detección de ARNm de E6/E7 en que se observa que su sobreexpresión está directamente relacionada con la progresión de la enfermedad⁵⁷.

Se han desarrollado técnicas para la caracterización viral una vez detectado el VPH, como la hibridación de los productos de amplificación con sondas específicas para cada tipo viral o la secuenciación, en la que mediante cebadores o dideoxinucleótidos marcados se obtiene la secuencia de bases del genoma viral⁵⁸. También existen ensayos para buscar las distintas variantes del VPH que ayuden a un mejor control y pronóstico de la infección^{59,60}.

Vaginosis

La vaginosis es la causa más frecuente de leucorrea. Para el diagnóstico no se recomienda el cultivo de *Gardnerella vaginalis*, debido a

que se puede recuperar de la vagina del 50% de las mujeres asintomáticas. El diagnóstico se puede basar en los criterios de Amsler que valoran el flujo vaginal (aspecto, pH, olor al añadir KOH y presencia de células clave), o mediante los criterios de Nugent o de Hay/Ison⁶¹ que valoran los morfotipos bacterianos que se observan en la tinción de Gram. Todos estos criterios tienen un amplio margen de subjetividad y, en muchas ocasiones, el resultado pertenece a la categoría de indeterminado. Para solventarlo, se han descrito pruebas de laboratorio tanto basadas en la determinación de actividad enzimática, como mediante técnicas de biología molecular. Un enfoque es determinar la presencia de elevadas concentraciones de *G. vaginalis* en exudados vaginales mediante sondas de ADN (Affirm VP III, Beckton Dickinson) que además determinan la presencia de *Trichomonas vaginalis* y de *Candida*. Por otro lado, se han desarrollado (aunque todavía no se han comercializado) técnicas de PCR en formato múltiple con excelente sensibilidad y especificidad que semicuantifican varios microorganismos implicados en la vaginosis, bien con papel patógeno (*G. vaginalis*, *Atopobium vaginae* y *Megasphaera-1*) o con papel protector, como *Lactobacillus crispatus*⁶².

Candidiasis

En el caso de las vulvovaginitis por *Candida*, el desarrollo de TBM es muy incipiente debido al precio y a la complejidad técnica, frente a la facilidad que presenta el cultivo. Está disponible en el mercado el sistema Affirm VP III que, como ya se ha citado, determina la presencia de *G. vaginalis*, *T. vaginalis* y *Candida* spp.

Otras: sarna y Molluscum

Sarna

Se ha estudiado por TBM en casos de manifestaciones cutáneas atípicas y en búsqueda de resistencia a acaricidas. Se ha usado una PCR cuantitativa de torundas de lesiones de sarna en vez de raspados y mide la disminución del parásito después del tratamiento⁶³.

Molluscum contagiosum

Se ha utilizado para caracterizar los 4 genotipos del virus y en muestras de torundas con una PCR en tiempo real¹.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Vazquez F, Otero L, Melón S, De Oña M. Overview of molecular biological methods for the detection of pathogens causing sexually transmitted infections. *Methods Mol Biol.* 2012;903:1-20.
- Bignell C, Fitzgerald M; Guideline Development Group; British Association for Sexual Health and HIV UK. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. *Int J STD AIDS.* 2011;22:541-7.
- Hopkins MJ, Ashton LJ, Alloba F, Alawattagama A, Hart IJ. Validation of a laboratory-developed real-time PCR protocol for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine. *Sex Transm Infect.* 2010;86:207-11.
- Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, Welsch J, Holden J, Ho SY, et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for the Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3236-43.
- Cao B, Wang S, Tian Z, Hu P, Feng L, Wang L. DNA Microarray Characterization of Pathogens Associated with Sexually Transmitted Diseases. *PLoS One.* 2015;10:e0133927.
- Edwards T, Burke PA, Smalley HB, Gillies L, Hobbs G. Loop-mediated isothermal amplification test for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples and tolerance of the assay to the presence of urea. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2163-5.
- Buckley C, Trembizki E, Donovan B, Chen M, Freeman K, Guy R, et al. Gonorrhoea Resistance Assessment by Nucleic Acid Detection (GRAND) Study Investigators. Real-time PCR detection of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to penicillin. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:3090-5.
- Hemarajata P, Yang S, Soge OO, Humphries RM, Klausner JD. Performance and Verification of a Real-Time PCR Assay Targeting the *gyrA* Gene for Prediction of Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2016;54:805-8.
- Trembizki E, Buckley C, Donovan B, Chen M, Guy R, Kaldor J, et al. Direct real-time PCR-based detection of *Neisseria gonorrhoeae* 23S rRNA mutations associated with azithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:3244-9.
- Donà V, Kasraian S, Lupo A, Guilarte YN, Hauser C, Furrer H, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay with High-Resolution Melting Analysis for Characterization of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2074-81.
- Pond MJ, Hall CL, Miari VF, Cole M, Laing KG, Jagatia H, et al. Accurate detection of *Neisseria gonorrhoeae* ciprofloxacin susceptibility directly from genital and extragenital clinical samples: towards genotype-guided antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:897-902.
- Low N, Unemo M. Molecular tests for the detection of antimicrobial resistant *Neisseria gonorrhoeae*: when, where, and how to use? *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:45-51.
- Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F; Chlamydia Primary Care Group. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis.* 2013;13:388.
- Schachter J, Chernesky MA, Willis D, Fine P, Martin D, Fuller D, et al. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. *Sex Transm Dis.* 2005;32:725-8.
- Nwokolo NC, Dragovic B, Patel S, Tong CY, Barker G, Radcliffe K. 2015 UK national guideline for the management of infection with *Chlamydia trachomatis*. *Int J STD AIDS.* 2016;27:251-67.
- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*—2014. *MMWR Recomm Rep.* 2014;63(RR-02):1-19.
- White J, O'Farrell N, Daniels D; British Association for Sexual Health and HIV. 2013 UK National Guideline for the management of lymphogranuloma venereum: Clinical Effectiveness Group of the British Association for Sexual Health and HIV (CEG/BASHH) Guideline development group. *Int J STD AIDS.* 2013;24:593-601.
- Zhang N, Wang R, Li X, Liu X, Tang Z, Liu Y. Are *Ureaplasma* spp a cause of nongonococcal urethritis? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e113771.
- Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, et al. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. *Int J STD AIDS.* 2014;25:294-8.
- Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:498-514.
- Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: A meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2015;61:418-26.
- Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30:1650-16.
- Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bebear C, Pereyre S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1549-55.
- Shimada Y, Deguchi T, Nakane K, Masue T, Yasuda M, Yokoi S, et al. Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36:255-8.
- Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potočnik M, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28:1581-93.
- Heymans R, Van der Helm JJ, De Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol.* 2010;48:497-502.
- Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol.* 2012;50:546-52.
- Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavasini M, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:127-9.
- Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis.* 1998;25:408-14.
- Carter JS, Kemp DJ. A colorimetric detection system for *Calymatobacterium granulomatis*. *Sex Transm Infect.* 2000;76:134-6.
- Lewis DA, Ison CA. Chancroid. *Sex Transm Infect.* 2006; 82 Suppl 4:iv19-20.
- Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS.* 2016;27:1275-82.
- Lewis DA, Mitjà O. *Haemophilus ducreyi*: from sexually transmitted infection to skin ulcer pathogen. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:52-7.
- Gnann JW Jr, Whitley RJ. Clinical Practice. Genital Herpes. *N Engl J Med.* 2016;375:666-74.
- Ramaswamy M, McDonald C, Smith M, Thomas D, Maxwell S, Tenant-Flowers M, et al. Diagnosis of genital herpes by real time PCR in routine clinical practice. *Sex Transm Infect.* 2004;80:406-10.
- Hidalgo F, Melón S, De Oña M, Do Santos V, Martínez A, Cimadevilla R, et al. Diagnosis of herpetic keratoconjunctivitis by nested polymerase chain reaction in human tear film. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17:120-3.
- Schmutzhard J, Merete Riedel H, Zwegyberg Würgart B, Grillner L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus

- in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol.* 2004;29:120-6.
38. Liu J, Yi J, Chen W, Si S, Yin M, Jin H, et al. Development and evaluation of the quantitative real-time PCR assay in detection and typing or herpes simplex virus in swab specimens from patients with genital herpes. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8: 18758-64.
 39. Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS.* 2016;27: 1275-82.
 40. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:459-72.
 41. Langston AA, Redei I, Caliendo AM, Somani J, Hutcherson D, Lonial S, et al. Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood.* 2002;99:1085-8.
 42. Field N, Clifton S, Alexander S, Ison CA, Khanom R, Saunders P, et al. *Trichomonas vaginalis* infection is uncommon in the British general population: implications for clinical testing and public health screening. *Sex Transm Infect.* 2016. doi: 10.1136/sextrans-2016-052660. [Epub ahead of print].
 43. Horner PJ, Blee K, Falk L, Van der Meijden W, Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS.* 2016;27:928-37.
 44. Mabey D, Ackers J, Adu-Sarkodie Y. *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect.* 2006;82 Suppl 4:iv26-7.
 45. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 3205-10.
 46. Goo YK, Shin WS, Yang HW, Joo SY, Song SM, Ryu JS, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification targeting actin DNA of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol.* 2016;54:329-34.
 47. Gaydos CA, Hobbs M, Marrazzo J, Schwebke J, Coleman JS, Masek B, et al. Rapid Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* by testing vaginal swabs in an Isothermal Helicase-Dependent AmpliVue Assay. *Sex Transm Dis.* 2016;43:369-73.
 48. Sonkar SC, Sachdev D, Mishra PK, Kumar A, Mittal P, Saluja D. A molecular-beacon-based asymmetric PCR assay for easy visualization of amplicons in the diagnosis of trichomoniasis. *Biosens Bioelectron.* 2016;86:41-7.
 49. Shafir SC, Sorvillo FJ. Viability of *Trichomonas vaginalis* in urine: epidemiologic and clinical implications. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 3787-9.
 50. Van der Veer C, Himschoot M, Bruisten SM. Multilocus sequence typing of *Trichomonas vaginalis* clinical samples from Amsterdam, the Netherlands. *BMJ Open.* 2016;6:e013997.
 51. Bladé AT, Saladrigues MP, Gimferrer MC, Quitllet FA, Ortiz DA, Piqué XC, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Prog Obstet Ginecol.* 2014;57 Supl 1:1-53.
 52. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:342-50.
 53. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer.* 2015;136:98-107.
 54. Alemany L, Cubilla A, Haleb G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol.* 2016;69: 953-61.
 55. Cobos C, Figueroa JA, Mirandola L, Colombo M, Summers G, Figueroa A, et al. The role of human papilloma virus (HPV) infection in non-anogenital cancer and the promise of immunotherapy: a review. *Int Rev Immunol.* 2014;33:383-401.
 56. Mateos Lindemann ML, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. 57. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. 2016. En: Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2016.
 57. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:291-319.
 58. De Oña M, Alvarez-Argüelles ME, Torrents M, Villa L, Rodríguez-Feijoo A, Palacio A, et al. Prevalence, evolution, and features of infection with human papillomavirus: a 15-year longitudinal study of routine screening of a women population in the north of Spain. *J Med Virol.* 2010;82:597-604.
 59. Lugo-Trampe A, Trujillo-Murillo KC, Rodríguez-Sánchez IP, Barboza-Cerda MC, Lugo-Trampe JJ, Hernández-Ramírez LC, et al. A PCR-RFLP method for typing human papillomavirus type 16 variants. *J Virol Methods.* 2013;187:338-44.
 60. Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martínez N, Anderson DN, Wheeler CM. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology.* 2005;338:22-34.
 61. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002;78:413-5.
 62. Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA, et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2321-9.
 63. Wong SS, Poon RW, Chau S, Wong SC, To KK, Cheng VC, et al. Development of conventional and Real-Time quantitative PCR assays for diagnosis and monitoring of scabies. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2095-102.