Bartonelosis en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos y su diagnóstico por PCR.

Bartonellosis in inmunocompetent and inmunocompromised patients and diagnosis by PCR.

**Introducción:** *Bartonella sp.* son bacilos gram negativos, intracelulares obligados; pertenecen al grupo Proteobacterias α2, emparentados filogenéticamente con el género *Brucella sp.* El mecanismo de patogénesis está relacionado con la proliferación vascular a través de la liberación de factores antiapoptóticos y de crecimiento vascular principalmente, teniendo como células target a los glóbulos rojos y endotelio vascular.

Las especies más importantes, que afectan al ser humano, son: *B. henselae,* agente etiológico de la enfermedad por arañazo de gato (AG) y síndrome linfangítico nodular (SLN); *B. quintana,* causa de bacteriemias agudas y crónicas; *B. bacilliformis,* causa de la fiebre de Oroya, enfermedad de Carrión o verruga peruana. En pacientes inmunosuprimidos, principalmente HIV positivos, con un recuento de linfocitos T CD4+ menor a 100 células/µl, las infecciones por *B. henselae y B. quintana*, producen granulomas vasculares denominados angiomatosis bacilar (AB) y peliosis hepato-esplénica (PHE) y ganglionar, la formación de quistes con contenido hemático en el parénquima de estos órganos. El diagnóstico es dificultoso, la histopatología es muy útil aunque es no patognomónica, la tinción de Warthin Starry evidencia la presencia de bacilos sólo en un 30% de los casos. La serología, es el método más difundido, sin embargo, presenta serorreactividad cruzada con otras bacterias intracelulares (*C. burnetti, Brucella spp, Chlamydophila spp.*). Los cultivos tradicionales presentan dificultades, deben realizarse durante periodos prolongados, por lo menos 6 semanas o cultivos en linajes celulares. Debido a las dificultades planteadas los métodos moleculares hacen al diagnóstico de forma rápida y con gran especificidad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sumamente ventajosa para establecer el diagnóstico de bartonelosis. Los objetivos planteados son: 1-Analisis epidemiológico, clínico y perfil bioquímico de pacientes afectados por *Bartonella sp.* 2-Estudio por PCR como una nueva herramienta para diagnóstico de *Bartonella sp.*

**Materiales y Métodos:** Estudio retrospectivo y descriptivo de 12 pacientes, atendidos por consultorios externos en el periodo 2011-2014, con sospecha de *Bartonella spp.* El diagnóstico se estableció luego de la presunción epidemiológica e infectológica y se confirmó mediante PCR. Los materiales clínicos obtenidos para el diagnóstico fueron: la punción de lesiones de piel, adenopatías y sangre entera.

Procesamiento de las muestras y diagnóstico molecular por PCR: Extracción de ADN con el kit de extracción de ADN NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). Fueron usados un total de hasta 25 mg de tejido o 200 µl de sangre con EDTA. Luego se realizó PCR multiplex con 2 conjuntos de cebadores: (F: forward ó directo, R: reverse ó indirecto) un cebador F PAPn1 y uno R PAPn2 los cuales generan producto de 275 pb. y los cebadores PAPn1 y el R PAPns2 que generan otro de 209 pb. (Amplifican regiones del gen *pap31* de *Bartonella sp.*). Secuencias de los cebadores: PAPn1: 5’-TTCTAGGAGTTGAAACCGAT-3’, PAPn2: 5’-GAAACACCACCAGCAACATA-3’ y PAPns2: 5’-GCACCAGACCATTTTTCCTT-3’. Para la PCR se utilizó: ADN 8 µl, 0,5 µM de cada primer, 0,5 mM de dNTPs, 5 U/ µl de TAQpol (Fermentas), Buffer de reacción (10X) y 2,5 mM de MgCl2 . Se trabajó con un volumen final de 40 µl. La PCR fue llevada a cabo con termociclador Bio-Rad MyCycler con una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C más 35 ciclos de 20 s de 94°C, 25 s de 57°C y 30 s a 72°C, con una extensión final de 3 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, usando colorante intercalante de bases GelRed (Biotium).

**Resultados:** Se estudiaron 12 pacientes con diagnóstico de *Bartonella spp.* por PCR, seis (50%) fueron de sexo masculino. La mediana de edad fue de 28 años (rango 4-73). Todos los pacientes provenían de zonas urbanas. Ocho pacientes (66,6%) tuvieron contacto previo con gatos, 3/12 (25%) refirieron contacto con gatos y perros mientras que un paciente (8,3%) presento sólo contacto con perros. Solo una paciente padecía riesgo ocupacional, siendo médica veterinaria

Los motivos de consulta más frecuentemente observados fueron: lesiones en piel en 9/12 pacientes (75%), adenopatías en 9/12 (75%), SLN 5/12 (41,6%). Los índices hematimétricos y perfil bioquímico fueron obtenidos en 9 pacientes, las medianas fueron las siguientes: hematocrito 36 (33-43), leucocitos 6500 cel/µl (3000 – 17200), plaquetas 247000/µ (156000-359000), TGO 38 (16-48), TGP 32 (10-99), FAL 152 (92-1996).

Cinco pacientes (41,6%) presentaron serología reactiva para HIV con mediana de recuento de linfocitos T cd4: 54 cels. /µl (7-120). 4/5 pacientes (80%) recibía TARGA y solo uno no recibía profilaxis para *Pneumocystis jiroveci* (PJP) con trimetoprima sulfametoxazol (TMS). De los 5 pacientes HIV reactivos, 4 (80%) presentaron infecciones concomitantes, tres tuvieron Sarcoma de Kaposi (SK) y el restante presentó Histoplasmosis diseminada (HD). Una paciente pediátrica HIV no reactiva tuvo coinfección con Tuberculosis (TBC) con afectación ganglionar.

Los síndromes clínicos observados fueron AB en 5 pacientes (41,6%), todos con serología para HIV reactiva y de los cuales en un 80% presentaron PHE. En 4 pacientes (33,3%) se observó como presentación clínica el arañazo de gato y los tres pacientes restantes (25%) presento SLN. Las muestras clínicas fueron obtenidas para su diagnóstico mediante punción y aspiración de las lesiones de piel y/o adenopatías o por extracción sanguínea.

**Discusión:** En este trabajo el diagnostico de Bartonelosis se pudo vincular con la exposición a gatos parasitados (*C. felis*) y/o perros concomitantemente en 11/12 pacientes y solo un paciente manifestó sólo contacto con perros, en este caso*,* probablemente *Ctenocephalides canis* sea su vector. El motivo de consulta más frecuente fue: lesiones de piel y compromiso ganglionar. Desde el punto de vista bioquímico las medianas de los parámetros estudiados no se vieron afectadas.

La forma clínica más frecuentemente observada fue la AB asociada a PHE, todos estos pacientes eran HIV positivos y el 80% tuvieron un recuento de linfocitos T cd4 menor a 100cel/µl. Coincidiendo con otras series la profilaxis con TMS no es suficiente para evitar la Bartonelosis. Otras de las formas clínicas observadas fueron el AG y el SLN. Destacamos también, la coinfección con otras entidades, principalmente TBC e HD, estableciéndose no solo como diagnóstico diferencial sino como coinfección en pacientes con compromiso de piel y adenopático.

PALABRAS CLAVES: *Bartonella sp.* Diagnóstico. PCR.

**Bibliografia:**

1. Jean-Marc Rolain, Hubert Lepidi, Michel Zanaret, Jean-Michel Triglia, Gérard Michel, Pascal-Alexandre Thomas et al. Lymph Node Biopsy Specimens and

Diagnosis of Cat-scratch Disease. 2006. Emerging Infectious Diseases. Vol. 12. (9); 1338- 1344.

1. Jorge L. D. Gazineo, Beatriz M. Trope, Juan P. Maceira, Sílvia B. May, Janice M. C. de O. Coelho, John S. Lambert et al. Bacillary Angiomatosis: Description of 13 cases reported in five reference centers for AIDS treatment in Rio de Janeiro, Brazil. 2001. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 43(1);1-6.
2. J. M. Rolain, P. Brouqui, J.E. Koehler, C. Maguina, M. J. Dolan, D. Raoult. Recommendations for Treatment of Human Infections Caused by *Bartonella* Species. 2004. Antimicrob. Agents. Chemother. Vol. 48. (6); 1921-1933.
3. Corti M, Villafañe F, Castello T, Mendez N, Gancedo E, Palmieri O. Bacillar angiomatosis and hepatic peliosis in an AIDS patients. Medicina (Buenos Aires) 2006; 66(2): 153.