

Sesión 31 Métodos moleculares de diagnóstico

481

PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN *LEGIONELLA* SPP Y *LEGIONELLA PNEUMOPHYLA* EN AGUAS

B. Bermejo, A. Antón e I. Avalos

Unidad Virología y Microbiología Molecular. Laboratorio Análisis Dr. Echevarne. Barcelona.

Introducción: El control de la legionelosis constituye un reto para las autoridades sanitarias. En los últimos años la contaminación hídrica por *legionella pneumophilla* ha sido causante de brotes de la enfermedad en centros asistenciales y de servicio público de Catalunya y otras regiones de España. En este trabajo hemos validado la PCR en tiempo real como herramienta alternativa y/o complementaria al diagnóstico microbiológico convencional, cuya rapidez permita tomar decisiones terapéuticas específicas y medidas precoces de control epidemiológico.

Materiales y métodos: Para la detección molecular de *Legionella* spp y *Legionella pneumophila* se seleccionaron los genes 16S rRNA y mip (macrophage inhibitor potentiator gene), respectivamente. Para evaluar el rendimiento del proceso de extracción y excluir posibles inhibiciones en la PCR se incluyó la amplificación de un control interno que se añadió durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el SMART CYCLER (Cepheid-IZASA) usando como métodos de detección sondas TaqMan (genes 16S mRNA y mip) y el intercalante SYBR Green (control interno). Se prepararon estándares de cuantificación obtenidos a partir de diluciones seriadas de ADN de la cepa sg2-14 de *Legionella pneumophila* (10^6 - 1 ufc/ml) y se fijó el límite reproducible de sensibilidad en 100 ufc/L.

Resultados: La validación del ensayo se llevó a cabo con un panel de 100 muestras de aguas procedentes de torres de refrigeración, circuitos sanitarios, potables, termales, fuentes ornamentales, condensadores evaporativos, etc. Tras un análisis en paralelo por cultivo microbiológico y PCR a tiempo real se obtuvieron resultados coincidentes en 60% de los casos. El 22% de las muestras positivas por PCR fueron negativas y/o no valorables por cultivo microbiológico. Un 15% presentó valores en cultivo microbiológico por debajo de 100 ufc/L, límite de sensibilidad de nuestro ensayo. En el 3% de las muestras se detectaron inhibidores de la PCR.

Conclusiones: Hemos validado una técnica para la detección genética de *Legionella* spp y *Legionella pneumophyla* en muestras de agua como complemento a la microbiológica convencional. El interés de esta técnica es su ajustadísimo plazo de entrega: inferior a 24 horas, plazo muy ventajoso ante situaciones de brote, emergencia o cualquier otro motivo por el cual se requiera de diagnóstico molecular rápido y preciso.

482

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE ST. LOUIS COMO AGENTE CAUSAL DE UN BROTE DE ENCEFALITIS EN CÓRDOBA (ARGENTINA)

A. Vázquez¹, L.A. Díaz², W. Almirón³, L. Spinsanti², V. Ré², M.P. Sánchez-Seco^{1,4}, J. Aguilar², A. Fariás², A. Visintín³, M. Contigiani² y A. Tenorio¹

¹Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Viricas Importadas, CNM, ISCH. ²Laboratorio de Arbovirus y Arenavirus (Sección Ecología), Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella" Facultad de Ciencias Médicas, U. N. de Córdoba, Argentina. ³Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, U. N. de Córdoba. ⁴Unidad de Alertas y Emergencias, CNM, ISCH.

Entre enero y mayo del 2005, murieron 5 personas en Córdoba (Argentina) durante un brote de encefalitis que afectó

a todos los grupos etarios aunque los casos de mayor gravedad se notificaron en adultos mayores. El diagnóstico inicial, basado en la serología, demostró que la infección era debida a un flavivirus, siendo negativos todos los intentos de cultivo viral sobre las muestras clínicas (suero y líquido cefalorraquídeo). La rápida expansión del flavivirus West Nile en América de Norte y Central tras su súbita aparición en la ciudad de Nueva York en el otoño de 1999, hizo sospechar una posible expansión hacia América del Sur, mediada quizás por migraciones de aves, el principal reservorio del virus. La colaboración establecida entre laboratorios pertenecientes a la Red Iberoamericana de Virosis Emergentes permitió la rápida identificación y caracterización del agente etiológico responsable.

Objetivo: Determinar el agente etiológico responsable del brote a partir de los mosquitos que pudieron actuar como potenciales vectores de la infección.

Materiales y métodos: Se capturaron mosquitos en la residencia de un paciente con encefalitis causada por flavivirus. Los mosquitos se agruparon según especie, fecha y lugar de captura y se ensayó la presencia del genoma de flavivirus utilizando un método de amplificación genómica genérica diseñado en el gen de la polimerasa viral. Para una caracterización adicional del agente causal y poder determinar su genotipo, se amplificó mediante RT-nested-PCR el gen completo de la glicoproteína.

Resultados: Se recolectaron 393 mosquitos agrupados en 7 pools, en 3 de los cuales (2 de *Culex quinquefasciatus* y 1 de *Culex. interfor*) se obtuvieron secuencias altamente homólogas a las previamente conocidas del virus de la Encefalitis de St. Louis (SLEV). En 2 de las 3 muestras en las que se detectó la presencia de genoma de SLEV se pudo amplificar la glicoproteína viral completa e identificar que el virus detectado pertenecía al genotipo III.

Conclusiones: Por métodos indirectos pudo demostrarse que el genotipo III del SLEV, exclusivo de Argentina y para quién no se había descrito circulación durante los últimos 25 años, ha sido el agente etiológico responsable de este brote, y que probablemente se ha mantenido de manera silente durante todo este tiempo en su ciclo natural vector-reservorio.

483

CANDIDA DUBLINIENSIS AISLADAS DE MUESTRAS RESPIRATORIAS: IDENTIFICACIÓN, FRECUENCIA, Y DIFERENCIACIÓN FRENTE A C. ALBICANS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

D. Velasco, G. Bou, A. Cañizares. E. Torres y R. Villanueva
Servicio de Microbiología. CHU Juan Canalejo. A Coruña.

Introducción: *C. dubliniensis* (CD) se describió como especie patógena en 1995. Se aísla sobre todo en muestras del tracto respiratorio en pacientes HIV+. También se ha descrito en infecciones de tracto urinario y bacteriemias. CD está muy relacionada filogenéticamente con *C. albicans* y es difícil diferenciarlas fenotípicamente. Se utilizan la capacidad de crecimiento a 42 y 45°C, la asimilación de sustratos y el color de las colonias en medios cromogénicos. En el medio de Cromagar® Candida (Becton-Dickinson) CD y *C. albicans* crecen formando colonias verdes. La identificación definitiva de CD requiere el uso de métodos moleculares, como la detección de secuencias genéticas específicas mediante PCR.

Objetivos: 1. Identificar y determinar la frecuencia de CD en muestras respiratorias considerando los aislamientos de levaduras que rinden color verde en el medio cromogénico Cromagar® Candida, es decir en cepas presuntamente identificadas como *C. albicans*. 2. Caracterizar los aislamientos de CD: Identificación mediante galería Api 32 C (Biomérieux) y estudio de sensibilidad antifúngica.

Material y métodos: 186 aislamientos de levaduras de color verde en el medio Cromagar® Candida procedentes de muestras de origen respiratorio Capacidad de crecimiento a 42 y 45°C en medio de Sabouraud glucosado e incubación du-

rante 48h. PCR específica para CD (Donnelly SM. Microbiology (1999), 145) incluyendo control interno (región génica correspondiente a ARNr presente en todas las especies fúngicas) evitando así falsos negativos para CD Cepas identificadas como CD: Determinación de la sensibilidad antifúngica mediante microdilución Sensititre Yeast One® (Izasa) para azoles y flucitosina, y mediante E-test (AB Biodisk) para anfotericina B. Identificación fenotípica mediante Api 32C.

Resultados: De las 186 cepas 4 resultaron positivas para la PCR específica de CD Eran incapaces de crecer ni a 42 ni a 45°C y fueron identificadas correctamente por el sistema Api 32 C. Todas las cepas negativas para la reacción de PCR específica crecieron a 42°C. Solo 166 lo hicieron a 45°C Los 4 aislamientos de CD resultaron sensibles a todos los antifúngicos ensayados.

Conclusiones: El 2,2% de las cepas de levaduras que producen color verde en la placa de Cromagar Candida en muestras respiratorias no son *C. albicans* sino CD, por lo que la utilización aislada de un medio cromogénico conlleva errores en la identificación que pueden repercutir negativamente en el conocimiento del significado clínico y de las características epidemiológicas de CD en el contexto de las infecciones producidas por levaduras. La mitad de las cepas de CD recuperadas pertenecen a pacientes HIV+.

484

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA AMPLIFICACIÓN GENÓMICA DE VIRUS ADN

M.E. Álvarez Argüelles, L. Villa Bajo, M. de Oña Navarro, A. Sampere Martínez, J. Fernández Suárez S. Melón García
Sección de Virología, Servicio de Microbiología, HUCA, Oviedo.

Introducción: Para la detección de material genómico de microorganismos en muestras biológicas es crucial la preparación de las mismas. Los protocolos de preparación genómica precisan de personal experto, en ocasiones son laboriosos, su efectividad depende del tipo de muestra y de la carga viral de la misma y no permiten ser aplicados en un laboratorio con un gran volumen de muestras. Actualmente, se están desarrollando técnicas automatizadas que podrían solventar estos inconvenientes.

Objetivos: Comparar de forma prospectiva y en paralelo la eficacia de la de extracción de material genómico mediante un tratamiento enzimático de la muestra y un método de extracción automatizada, para la detección de virus ADN.

Material y métodos: Se estudiaron en paralelo 135 orinas y 112 plasmas. De las orinas, se centrifugaron 500 µl a 6.000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante dejando 50 µl del sedimento al que se añadieron 50 µl de un tampón que contenía proteinasa K, Igepal, Tween 80 y tampón con una base de Tris y se mantuvo 45' a 55°C con agitación, posteriormente se desactivó la PK 10' a 95°C. Los plasmas se trataron con 100 µl del mismo tampón de lisis partiendo de 100 µl de plasma. Para la extracción automática 1 ml de cada tipo de muestra se procesó en el "Cobas AMPLIPREP" (Roche®, USA). Posteriormente, se realizó la PCR "nested" múltiple frente a los virus BK y JC con cebadores que amplifican las regiones del antígeno T-large de ambos.

Resultados: De las 135 orinas, se detectó el VBK por el método enzimático en 39 de ellas (28,8%) y por el método automatizado en 37 (27,4%) (p > 0,05). En los plasmas se detectaron 10 VBK (8,9%) por el método automatizado y solo 2 (1,8%) por el método manual (p < 0,05). En el caso del virus JC, en orina ambas técnicas eran igualmente sensibles, ya que se detectó el virus en 32 (23,7%) por la técnica enzimática y en 31 por la técnica automatizada (22,9%). Sin embargo, la sensibilidad fue diferente en el caso de los plasmas, ya que por el sistema automatizado fueron positivos 14 (12,5%) frente a 2 (1,78%) por la técnica enzimática (p < 0,01).

Conclusiones: La preparación del material genómico con un método automatizado, en comparación con un método de ex-

tracción enzimático manual, mejoró el rendimiento diagnóstico en muestras de plasma, tanto para el VBK como para el VJC, pero no tuvo repercusión en las muestras de orina.

485

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DEL CITOMEGALOVIRUS (CMV) EN PLASMA DE PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS (TALOG).

A. Blasco¹, D. Navalpotro², D. Navarro^{2,4}, C. Solano^{3,4}, J. García², M. Pastor², O. Fraile², J.C. Hernández Boluda³, C. Gimeno^{2,4}

Servicio de Microbiología. H. Morales Meseguer¹ (Murcia).
Servicios de Microbiología² y Hematología³ del H. Clínico Universitario y Facultad de Medicina. Valencia.

Introducción: El CMV es uno de los patógenos oportunistas más comunes en pacientes tratados con TALOG; siendo una causa importante de morbilidad-mortalidad en estos pacientes. El éxito de una terapia preventiva frente a las infecciones y/o reactivaciones por CMV, depende de la disponibilidad de técnicas de valor diagnóstico demostrado, como la antigenemia pp65. La cuantificación de DNA viral en sangre periférica, puede ser considerada actualmente como una ayuda al diagnóstico precoz.

Objetivos: Evaluación comparativa de los métodos moleculares para la detección de DNA de CMV, en pacientes tratados con TALOG.

Material y métodos: Se analizan los resultados de las antigenemias pp65 (Light Diagnostics. Palex) y de las cargas virales mediante PCR Roche Monitor (Roche Monitor) y PCR Real-Time Abbott, cuyo límite de detección es de 400 copias/mL y de 50 copias/mL, respectivamente, realizadas durante 2005, a 40 pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas.

Resultados: Se realizaron 434 antigenemias pp65 y 285 determinaciones de carga viral, siendo positiva la antigenemia en el 11% (47 episodios). En el 50% de las antigenemias positivas (rango de células positivas de 1 a 15 / 200.000), la carga viral Roche Monitor fue indetectable. La PCR RT Abbott resultó positiva en todos los casos donde la antigenemia y la carga viral (Roche Monitor) eran positivas. En un 53% de los casos con antigenemia positiva y Roche Monitor negativa, detectamos DNA de CMV mediante PCR RT Abbott. Las cargas del CMV presentes en estas muestras (antigenemia positiva y Monitor Roche negativa) se encontraron en el rango (50-780 copias/mL). En el 26,6% de los episodios de replicación viral de CMV, la PCR RT Abbott se adelantó al menos 1 semana a la positividad de la antigenemia, en contraposición al 13,3% de la PCR Roche Monitor.

Conclusión: La PCR RT Abbott se correlaciona mejor con la antigenemia pp65 que la PCR Monitor Roche (probablemente debido a que en estos pacientes la replicación viral y la cantidad de DNA del CMV en plasma, es inicialmente baja y no aumenta, ya que se instaura rápidamente terapia anticipada) y permite adelantar de forma apreciable (en un 13% de los casos) la detección de infecciones y/o reactivaciones por CMV, pudiendo modificar la pauta de inicio de la terapia antiviral anticipada, en los pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas (TALOG).

486

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CMV EN SANGRE

T. Ta, M.A. Molina, M. Tato, M. Mateos y F. Baquero

Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

Introducción: El CMV es un patógeno importante en receptores de trasplante tanto de TOS como TPH. El método de elección para medir la carga viral de CMV en plasma en enfermos con sospecha de infección es la PCR cuantitativa.

Objetivos: Comparar dos métodos de extracción de ADN del CMV en plasma para la cuantificación: extracción automática y extracción manual así como determinar el método más conveniente.

Materiales y métodos: Se han estudiado 121 muestras de plasma de 73 pacientes (26 M, 47 H). Para la cuantificación del ADN de CMV se ha utilizado el reactivo COBAS AmpliCor CMV Monitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La extracción del ADN del CMV se ha realizado por dos métodos: manual y automática. En ambos métodos se ha incluido un control positivo además del propio control interno en cada muestra. Para la concordancia de resultados se ha utilizado el índice kappa y la gráfica de Bland y Altman.

Resultados: De 121 muestras estudiadas, 23 muestras han resultado positivas, 86 muestras han resultado negativas y 12 muestras tienen resultados discordantes (4 muestras son positivas en ambos métodos pero con una diferencia mayor de 0,5log, 7 han sido positivos en el método automático y negativo en la manual y 1 ha sido positivo en el manual y negativo en la automática). El índice kappa obtenido es 0,83 (grado de concordancia "excelente"). La gráfica de Bland y Altman indica que los dos métodos son muy similares y el automático es más adecuado.

Discusión: Los resultados obtenidos con los dos métodos de extracción son similares, con un grado de concordancia excelente según el índice kappa. El rango dinámico es similar en los dos métodos (límite inferior 286 y 323 c/mL, límite superior 2.87x10⁵ y 6.03x10⁵ c/mL). Se han encontrado mayor número de resultados positivos con la extracción automática (34/121 vs 28/121). Según el análisis estadístico realizado el método de extracción automático presenta ventajas sobre el manual cuando los resultados son inferiores a 10³ de copias/mL. La PCR convencional con extracción manual es un método laborioso cuyos inconvenientes se evitan con la extracción automática. Sus principales ventajas son facilidad de realización, escaso aparatado y no requiere experiencia del personal en técnicas de Biología Molecular.

Conclusión: Recomendamos la total automatización de la cuantificación del ADN de CMV para diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad por CMV.

487

PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE ADN PROVÍRICO DE HIV-1

B. Bermejo, A. Antón e I. Ávalos

Unidad Virología y Microbiología Molecular. Laboratorio de Análisis Dr. Echevarne. Barcelona.

Introducción: Entre los métodos virológicos alternativos a la serología para el diagnóstico y seguimiento de la infección por HIV destaca la detección del genoma viral libre o integrado, por técnicas de biología molecular. Esta metodología tiene como reto mantener su especificidad a pesar de la alta frecuencia de mutación de este virus, que ha influido en la retirada del mercado de algunos kits comerciales. Ya que en el momento actual no disponemos de una normativa sanitaria vinculante para la detección de ADN provírico del HIV-1 en muestras clínicas, en nuestro laboratorio hemos desarrollado una PCR anidada ("nested"), que permita abarcar el mayor número de variantes intratípicas del grupo M, con mayor prevalencia en la población caucásica.

Materiales y métodos: Se seleccionaron primers específicos que promueven la amplificación de regiones conservadas de los locis GAG, ENV y POL. Estos iniciadores han sido reportados por Fenyo (1990) y Boucher (1996), y están diseñados para una "nested" PCR que garantice la detección del ADN provírico de los subtipos A-G pertenecientes al grupo M del HIV-1. Hemos optimizado las condiciones para la "nested" PCR a tiempo real, utilizando el Smart Cycler (Cepheid-IZASA) y SYBR Green como método de detección por fluorescencia. Además se amplifica un gen constitutivo (Beta-actina humana) para detectar posibles inhibiciones y controlar el rendimiento del proceso de extracción de ácidos nucleicos.

Resultados: El análisis de las curvas de disociación de más de 10 controles positivos permitió establecer la media de las Tm. de los productos amplificados: GAG: 80,48 °C+0,5; ENV: 75,99 °C +0,5 y POL:78,97°C +0,5 La interpretación de los resultados fue la siguiente: i) positivo: PCR positiva para los 3 locis ii) indeterminado: PCR positiva en 1 o 2 de tres locis, y se recomienda el estudio de una nueva muestra iii) negativo: PCR negativa para los 3 locis Presentamos el resultado del estudio de muestras clínicas procedentes de niños con menos de 15 meses de edad hijos de seropositivas y de pacientes sometidos a terapia antirretroviral con viremia indetectable.

Conclusiones: Esta técnica diagnóstica cumple con los requisitos técnicos referenciados internacionalmente, con los controles de calidad y con las recomendaciones de asociaciones especializadas para la detección de ADN provírico de HIV-1.

488

INFECCIONES POR NOCARDIA EN UN HOSPITAL TERCIARIO DURANTE UN PERIODO DE 15 AÑOS: COMPARACIÓN DE LA SECUENCIACIÓN Y LOS PATRONES DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA COMO MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

M. García-Álvarez, F. Chaves, J. Villar, A. Rodríguez, E. Palenque y J.R. Otero

Servicio de Microbiología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Introducción: La infección por *Nocardia* es una entidad poco frecuente en nuestro medio. Las dificultades en el crecimiento y la gran variedad de especies descritas dificulta la identificación a nivel de especie. Por ello nos planteamos como objetivo revisar los casos de nocardiosis diagnosticados en nuestro hospital, y aplicar y comparar la secuenciación del gen 16S ARNr y el patrón de sensibilidad antibiótica en la identificación a nivel de especie.

Métodos: Se estudiaron 22 cepas de *Nocardia* aisladas entre los años 1990 y 2005. Las características de los pacientes fueron obtenidas a través de la revisión de las historias clínicas. La sensibilidad antibiótica se realizó en placas de Mueller-Hinton con un inóculo de 0,5 McFarland, incubándose a 37°C durante 48-72 horas. Los discos utilizados para la identificación fueron ciprofloxacino, gentamicina, tobramicina, amikacina y eritromicina (J Clin Microbiol, 2002; 40: 1346-1351). Mediante tiras de E-test se ensayaron imipenem, cefotaxima, amikacina, eritromicina y cotrimoxazol. La interpretación de las pruebas de sensibilidad se realizó siguiendo las normas del CLSI. La identificación molecular se realizó mediante secuenciación del gen 16S ARNr y análisis de las secuencias en la base de datos GenBank.

Resultados: La edad media de los pacientes fue de 54 años (rango 2-83), y el 86,3% eran varones. En 14 pacientes (63,6%) los aislamientos se realizaron en muestras respiratorias, 5 en biopsias de nódulos o abscesos de distinta procedencia, 1 en líquido sinovial y 2 en exudados de heridas. Los factores de riesgo para la nocardiosis fueron: tratamiento con corticoides (7), trasplante de órgano sólido (4), VIH (4), Fibrosis Quística (2), Cáncer de pulmón (1) y desconocidos (4). Mediante secuenciación se identificaron 5 especies distintas de *Nocardia*: 10 *N. farcinica* (45%), 4 *N. nova* (18%), 4 *N. asteroides* (18%), 1 *N. asiática* (4,5%), y 1 *N. elegans* (4,5%). La identificación mediante patrones de sensibilidad antibiótica dio lugar a 3 especies de *Nocardia*: 10 *N. farcinica* (45,4%), 6 *N. asteroides* (27,2%) y 5 *N. nova* (22,7%). En los 19 aislamientos en los que se dispuso de los dos métodos de identificación para comparar, hubo concordancia en 17 aislamientos (89,5%) y 2 casos discrepantes. La sensibilidad a los antimicrobianos fue variable entre especies. La especie más resistente a los antibióticos fue *N.farcinica*, y la más susceptible *N. asteroides*.

Conclusiones: *Nocardia farcinica* fue la especie más frecuentemente implicada en los casos de nocardiosis de nuestro hospital. Esta especie presentó una mayor resistencia a los antimicrobianos y mediante los discos de antibióticos fue correctamente identificada en todos los casos.

489

GENOTYPE MYCOBACTERIUM DIRECT®, NUEVA TÉCNICA DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE M. TUBERCULOSIS COMPLEX Y OTRAS MICOBACTERIAS ATÍPICAS EN MUESTRAS CLÍNICAS

F. Franco-Álvarez de Luna, A.D. García, P. Ruiz, J.B. Gutiérrez y M. Casal

Servicio de Microbiología-H. Universitario Reina Sofía-Córdoba.

Objetivos: Evaluar una nueva técnica genética, GENOTYPE MYCOBACTERIUM DIRECT® (GTMD), (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany) que basado en la tecnología NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) nos permite mediante la amplificación de 23S rARN, la detección de *M. tuberculosis Complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, y *M. malmoeense* directamente de los especímenes clínicos.

Material y métodos Se analizaron 80 muestras respiratorias y extrapulmonares (59 esputos, 1 BAL, 2 BAS, 1 líquidos pleurales, 6 biopsias de adenopatías, 1 exudados purulentos, 2 abscesos, 2 heces, 1 líquidos ascíticos, 2 líquidos cefalorraquídeos y 3 orinas) procedentes de 38 pacientes sospechosos de padecer tuberculosis u otro tipo de micobacteriosis. Las muestras, fueron descontaminadas, visualizadas mediante microscopía y sembradas en medios de cultivo MGIT y Lowenstein-Jensen. Se tomó una alícuota de 500µl para su preparación y procesamiento, de acuerdo con los protocolos de trabajo de la técnica a evaluar. Esta se divide en tres partes: 1. Estabilización y el aislamiento de ARN. 2. Amplificación isotérmica del ARN mediante NASBA, a 41°C. 3. Detección del producto amplificado mediante hibridación reversa. Todos los aislados en medios de cultivo fueron identificados mediante Genotype® Mycobacterium Assay.

Resultados: De 80 muestras totales, 59 dieron cultivo positivo para micobacterias. En 54 muestras se obtuvo crecimiento para *M. tuberculosis Complex*. Las muestras restantes fueron positivas para, *M. intracellulare* (2), *M. malmoeense* (1), *M. kansasii* (1) y *M. avium* (1). GTMD detectó un total de 60 muestras positivas. De éstas, 6 muestras fueron positivas donde el cultivo de micobacterias fue negativo. Esto indica una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de GTMD respecto al cultivo del 92%, 71%, 90% y 80% respectivamente. El Análisis de las discrepancias encontradas (resultados GTMD positivos con cultivo negativo) consideró un verdadero positivo para GTMD cuando los pacientes eran sospechosos de padecer tuberculosis pulmonar activa tras una revisión de la historia clínica y respondieron al tratamiento antimicobacteriano. Las 6 muestras fueron consideradas como verdaderos positivos, aumentado la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN al 91%,100%, 92% 100% respectivamente.

Conclusiones: GTMD, aunque muy manual todavía, es rápida (6h.), ya que puede realizarse y obtener resultados en una jornada de trabajo. Es muy fiable y además tiene la ventaja de poder detectar varias especies de micobacterias patógenas en un mismo ensayo y de la misma muestra clínica.

490

TIPADO DE HPV. COMPARACIÓN ENTRE PCR CON DIGESTIÓN POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MICROARRAYS

M. Domínguez-Gil*, R. Ortiz de Lejarazu, J.M. Eiros, B. Hernández, M. Moreno, C. Labayru, A. Curiel, A. Tenorio y M. Ortega

*Servicio de Microbiología. Hospital de Santa Bárbara. Puertollano (Ciudad Real). Departamento de Microbiología. Hospital Universitario de Valladolid. Facultad de Medicina. Valladolid.

Introducción: El tipado de papilomavirus humano (HPV) ha cobrado nueva importancia por la próxima aparición de vacunas de HPV contra algunos de los tipos más frecuentes implicados en fenómenos de transformación celular asociados a carcinoma cervical. En la actualidad pocos hospitales

realizan el tipado tras la detección de DNA genérico de HPV, ello puede condicionar disfunciones en el seguimiento clínico de las pacientes diagnosticadas. Por otra parte, los métodos empleados para el tipado ofrecen diferente rendimiento diagnóstico. En el presente estudio se comunican los resultados obtenidos por dos técnicas diferentes: PCR con digestión por enzimas de restricción y Microarrays.

Objetivo: Describir la correlación diagnóstica que existe entre dos técnicas empleadas para la detección y el tipado de DNA de HPV en muestras de cérvix de mujeres con sospecha de lesiones genitales por papilomavirus humano.

Métodos: Se seleccionaron un total de 40 muestras de cérvix en las que la técnica de hibridación había resultado positivo. Esta técnica de cribado inicial clasifica el virus en aquellos asociados a bajo o moderado-alto riesgo de transformación celular. En este estudio se analiza la correlación entre estos resultados obtenidos inicialmente por hibridación y los obtenidos por otras dos técnicas adicionales: PCR y posterior tipado con digestión por enzimas de restricción y una nueva técnica desarrollada de Microarrays.

Resultados: Los resultados obtenidos por hibridación fueron: en un 47% de las muestras se detectó HPV de moderado-alto riesgo, en un 40% se detectó ambos tipos de HPV, y en un 13% se detectó únicamente HPV de bajo riesgo de transformación celular. Al comparar dichos resultados con PCR y Microarrays un 25% y un 40% correspondían a HPV de moderado- alto riesgo, respectivamente; un 5% y un 40% presentaban ambos tipos de HPV y se detectó un 13% de HPV de bajo riesgo por Microarrays y ninguno mediante PCR. **CONCLUSIONES:** La detección de ADN de HPV mediante hibridación se asoció a resultados positivos en un mayor porcentaje de los casos que la técnica de PCR utilizada, siendo la concordancia mucho mayor entre hibridación y microarrays. La técnica de microarrays mostraba mejor correlación con la técnica de Hibridación para la detección y el consiguiente tipado de HPV que la PCR con digestión por enzimas de restricción.

491

EVALUACIÓN DE UNA PCR UNIVERSAL A TIEMPO REAL DEL GEN 16S rARN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENDOCARDITIS INFECCIOSA

M. Marín, M. del Rosal, P. Muñoz, M. Rodríguez-Créixems, L. Alcalá, C. Sánchez y E. Bouza en representación del Grupo de Apoyo al Manejo de la Endocarditis Infecciosa (GAME)

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

Introducción y objetivos: Tradicionalmente, la endocarditis infecciosa (EI) ha sido diagnosticada, desde el punto de vista microbiológico, por la positividad de los hemocultivos o de los cultivos del tejido valvular. En los últimos años, se ha propuesto introducir los resultados de la PCR universal del gen 16S rARN, como criterio mayor de Duke. Nuestro objetivo, ha sido evaluar la utilidad de una técnica de PCR universal del gen 16S rARN seguida de secuenciación y realizada en tejido de válvulas cardíacas (VC), para el diagnóstico de la EI.

Métodos: Se estudiaron 177 muestras de VC. 48 de ellas procedían de 35 pacientes diagnosticados de EI según los criterios de Duke y 129 de 120 pacientes sin EI. Las muestras se cultivaron por métodos convencionales y se analizaron en paralelo por PCR universal del gen 16S rARN en sistema Light Cyler. Los amplicones se caracterizaron por secuenciación y las secuencias se alinearon en Genebank. Los resultados obtenidos, se analizaron considerando los datos clínicos de los pacientes, los hemocultivos y los cultivos de VC.

Resultados: La PCR universal fue positiva en 46 muestras de pacientes con EI, en todas ellas el microorganismo identificado por secuenciación, coincidió con el obtenido en los hemocultivos. En 3 pacientes con EI y hemocultivos negativos, la PCR identificó a *Tropheryma whipplei*, *Bartonella quintana* y *Streptococcus gallolyticus* como microorganismos res-

ponsables de la EI. En estos casos, la identificación fue comprobada mediante PCR's específicas. Todas las muestras de pacientes con EI, amplificaron antes de ciclo 28 de la PCR. La PCR fue negativa en 123/129 muestras del grupo control y en 2 válvulas de un paciente con EI, todas ellas amplificaron después del ciclo 31. En 6 muestras de pacientes sin EI, la PCR fue positiva entre los ciclos 28 y 31. El tiempo necesario hasta obtener un resultado de PCR fue de 4 horas. La identificación definitiva del microorganismo por secuenciación se obtuvo en 48 horas. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de esta técnica fueron: 95,83%, 95,34%, 88,46% y 98, 37%.

Conclusión: Nuestro método de PCR universal a tiempo-real realizado directamente en VC, ha demostrado ser más sensible, específico y rápido que el cultivo tradicional. El ciclo de amplificación de la PCR podría permitir predecir si un paciente tiene EI.

Financiación: CAM (GR/SAL/0305/2004).

492

UTILIDAD DE LA PCR UNIVERSAL DEL GEN 16S rARN SEGUIDA DE SECUENCIACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE PRÓTESIS ARTICULAR

M. Marín, J.M. García-Lechuz, M. Sánchez, M. Cuervo, M. Villanueva, P. Alonso, L. Alcalá y E. Bouza

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Introducción y objetivo: El diagnóstico de las infecciones asociadas a prótesis articulares requiere un enfoque multidisciplinar y el cultivo de un número elevado de muestras. En los últimos años, se ha destacado la importancia de las técnicas de PCR universal, para el diagnóstico de diversas infecciones. El objetivo de este trabajo es conocer, la utilidad de la PCR universal del gen 16S rARN seguida de secuenciación, para el diagnóstico de las infecciones de prótesis articulares (IPA).

Métodos: Se estudiaron 153 muestras de biopsias de tejido periprotésico y 10 líquidos articulares de 49 pacientes sometidos a cirugía ortopédica con implantación de prótesis. Para el diagnóstico de IPA se consideraron los criterios revisados por Trampuz y cols. (Rev. Med. Microbiol. 2003;14:1-14) basados en datos clínicos, histológicos, de laboratorio, de imagen y microbiológicos. 15 pacientes fueron diagnosticados de IPA (50 muestras) y en 34 pacientes (103 muestras) se descartó la infección. Las muestras se analizaron en paralelo, mediante cultivo microbiológico convencional y PCR universal del gen 16S rARN. Los amplicones obtenidos se secuenciaron y las secuencias se alinearon en Genebank. Se compararon los resultados obtenidos con el cultivo y la PCR y se evaluó su utilidad para diagnosticar IPA.

Resultados: La PCR fue positiva para 14 pacientes con IPA y los microorganismos identificados por secuenciación coincidieron con los aislados en cultivo. La PCR fue negativa en un paciente con IPA y en 101/103 muestras control. El cultivo tuvo 22 falsos positivos. El tiempo de análisis para obtener un resultado de PCR, fue de 6 horas y de 48 horas para obtener la identificación del microorganismo por secuenciación. En la comparación del cultivo y la PCR, la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del cultivo fue: S = 86%, E = 79,81%, VPP = 67,19% y VPN = 92,22% y de la PCR: S = 88%, E = 98%, VPP = 95,65%, VPN = 94,44% comparados por muestras. Cuando el análisis se realizó por pacientes, los resultados fueron para el cultivo: S = 87%, E = 94%, VPP = 87% y VPN = 94% y para la PCR: S = 93%, E = 94%, VPP = 88%, VPN = 97%

Conclusión: Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que la PCR universal realizada en muestras de tejido periprotésico o líquido articular, es más rápida y específica que el cultivo para el diagnóstico de IPA.

Financiación: "Red Española de Investigación en Patología Infecciosa" (REIPI-C03/14).

493

MULTIPLEX FLUORESCENTE-PCR: NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN Y TIPAJE DE HPVM.P. Cañadas¹, G. Terry², V. Cirigliano¹, M.L. Junquera³, A. Lorinz⁴, R. Font⁵, M. Ejarque¹, F.X. Bosch⁵ y S. de Sanjose⁵¹Departamento de Biología Molecular. General Lab. Barcelona
²Department of Molecular Pathology, University College London, United Kingdom. ³Hospital Monte Naranco. Oviedo.
⁴Digene Corporation, Gaithersburg MD 20878 USA. ⁵Instituto Catalán de Oncología, Barcelona.

Objetivo: La infección persistente por tipos específicos del Virus del Papiloma Humano (VPH) ha sido identificada como la causa más importante del desarrollo del cáncer cervical. Por lo tanto, la detección de estos puede permitir la selección de pacientes que necesiten de una atención clínica adicional. Un requerimiento importante para esta aproximación es que la identificación de HPV sea altamente sensible y específica. El objetivo es evaluar un nuevo método Multiplex Fluorescente PCR (MF-PCR) de detección y tipaje de VPH. Los resultados se comparan con los obtenidos por Hybrid Capture[®] 2(HC2).

Material y métodos: Fueron obtenidas muestras endocervicales de 165 mujeres. El ADN extraído fue amplificado mediante Multiplex fluorescente PCR con 15 juegos de primers marcados con diferentes fluorocromos que reconocen los tipos VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Los productos son reconocidos por tamaño y color después de una electroforesis en un secuenciador ABI 3130 DNA el cual genera un programa de genotipado automático. El ensayo HC2 incluye una mezcla de sondas para la detección de 13 tipos de alto riesgo. El límite de detección fue de 1.0 pg/ml. Los ensayos fueron realizados a ciegas entre los diferentes laboratorios. La prueba estadística Kappa fue utilizada para la comparación entre los diferentes ensayos. Para la comparación estadística se categorizaron como negativos las muestras positivas para VPH 6 y 11.

Resultados y conclusiones: La detección de VPH fue de 27,9% para MF-PCR y 20,6% para HR-HC2. La detección global fue de 29,1%. Dos muestras fueron positivas para HC2 y negativas para MF-PCR y 14 positivas por MF-PCR y negativas para HC2. Usando HC 2 como test de referencia, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo fueron respectivamente 94,1%, 89,3%, 69,6% y 98,3%. El acuerdo en la detección de ADN-VPH entre MF-PCR y HC2 fue de Kappa = 0,74. En todas las muestras con lesión se detectó VPH mediante la técnica F-PCR. Los resultados obtenidos muestra que el ensayo MF-PCR es muy sensible detectando tipos específicos de alto riesgo oncogénico simultáneamente en una multiplex PCR, permitiendo a su vez la detección de infecciones múltiples. Esta técnica demuestra ser específica y rápida en genotipar VPH y la posibilidad de automatizar el análisis permite su aplicación a larga escala.

494

UTILIDAD DE LA MULTIPLEX-PCR EN LA TIPIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

J.M. Marimón, M. Ercibengoa, A. González, J. Larruskain y E. Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología. Hospital Donostia.

Introducción: La autorización de la vacuna neumocócica conjugada, la escasa inmunidad cruzada entre algunos serotipos de un mismo serogrupo y la introducción de nuevos serotipos multiresistentes hacen más necesaria la serotipificación para la adecuada caracterización de *S. pneumoniae*. Para facilitar la tipificación mediante el Quellung (técnica de referencia) han surgido nuevas técnicas moleculares que detectan los genes responsables de la síntesis de diferentes componentes de la cápsula.

Métodos: En base a los primers de Lawrence ER et al (JCM 2003; 41:601) y Brito DA et al (JCM 2003;41:2378) incluyendo los de los serotipos 6B y 18C y a las secuencias de otros serotipos disponibles en GenBank diseñamos una Multiplex-PCR capaz de detectar los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, y 23F de vacuna 7-valente, los serotipos 1, 3, y 7F de la vacuna 11-valente y los serotipos 11A, 15A, 19A, 21 y 36. Los ADNs se extrajeron hirviendo durante 10 minutos y se realizaron 3 PCRs simultáneas usando el QIAGEN Multiplex-PCR Kit y las condiciones: 1 ciclo a 95°C-15 m, 30 ciclos de 94°C-30s, 60°C-90s, 72°C-90s.

Resultados: Mediante Multiplex-PCR se estudió el serotipo de 401 aislamientos clínicos de *S. pneumoniae*. Los serotipos de 15 aislamientos eran conocidos previamente (controles positivos) y los restantes 386 se eligieron aleatoriamente de manera prospectiva y cuyo resultado del Quellung solo fue revelado al finalizar la investigación. 242 de los 386 aislamientos (62,7%) tenían serotipos incluidos en la Multiplex-PCR. La sensibilidad y especificidad fue absoluta para los serotipos 1, 3, 4, 14, 19A, 19F, 21, 23F y 36. Se observó que otras parejas de primers amplifican dos serotipos de cada serogrupo: 6A y 6B, 7A y 7F, 9A y 9V, 11A y D, 15A y 15F. Los primers del serogrupo 18C amplificaban todos los serotipos del serogrupo 18 (18A, B, C y F). Los primers originalmente descritos como específicos para los serotipos 6B y 18C no lo fueron. En ningún caso faltó sensibilidad y no hubo inespecificidad más allá de las de serogrupo anteriormente señaladas.

Conclusiones: La PCR es una técnica rápida y sensible para determinar los tipos capsulares de *S. pneumoniae*. Para algunos serogrupos (6, 7, 9, 11, 15 y 18) la similitud de las secuencias de sus genes capsulares no permite la serotipificación completa, por lo que será preciso completar la tipificación mediante el Quellung y seguir investigando la posibilidad de obtener una secuencia más específica.

495

DETECCIÓN DE ENTEROVIRUS EN SANGRE PERIFÉRICA POR RT-PCR EN TIEMPO-REAL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON SÍNDROME FEBRILM. García-Álvarez¹, M.D. Folgueira¹, P. Rojo² y J.R. Otero¹¹Servicio de Microbiología. ²Servicio de Pediatría. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

Introducción: Enterovirus es una causa común de infección durante la infancia, que se manifiesta desde un síndrome febril benigno hasta meningoencefalitis. El objetivo de este estudio fue determinar en qué proporción de los pacientes pediátricos que reciben un diagnóstico clínico de síndrome febril sin foco el agente causal fue Enterovirus. El estudio se realizó durante la época estacional de máxima incidencia de este patógeno.

Métodos: Del 15 de Mayo al 15 de Junio de 2005 se incluyeron en el estudio 96 pacientes que acudieron al servicio de urgencias pediátricas de un hospital terciario, por presentar un cuadro febril en el que no pudo filiarse el origen (se descartó la infección urinaria, pulmonar y meningea). La detección de Enterovirus se realizó en 96 muestras de sangre total mediante PCR en tiempo real. El ARN se extrajo a partir de 200 µl de sangre mediante el sistema semi-automático MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit (Roche Diagnostics, Nederland BV). Tras la retrotranscripción (RT), se realizó la PCR en el LightCycler Instrument versión 2.0 (Roche Molecular Biochemicals) con los siguientes parámetros de amplificación: 10 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, y 50 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C para la amplificación de la secuencia específica (gen 5'UTR). El producto de PCR se detectó mediante una sonda tipo TaqMan.

Resultados: La edad media de los pacientes fue de 2 años (rango de 24 días a 14 años). La amplificación para Enterovirus fue positiva en 23 (24%) de los 96 pacientes incluidos

en el estudio. El 78% de ellos fueron varones. La edad media de los pacientes con infección por Enterovirus fue de 18 meses (rango de 24 días a 9 años). De los 23 casos de infección por Enterovirus 9 (33%) se dieron en menores de 6 meses (n = 27), 11 (20,7%) en niños con edades comprendidas entre los 7 meses y los 3 años (n = 53), y los 3 (18,7%) casos restantes en niños mayores de 3 años (n = 16).

Conclusiones: Las infecciones por Enterovirus son una importante causa de síndrome febril sin foco en los niños menores de 3 años que acuden a la urgencia pediátrica durante la época estacional de máxima incidencia de este agente viral. La detección de Enterovirus en sangre periférica mediante RT-PCR en tiempo real es una técnica rápida y sensible para el diagnóstico de estas infecciones, que puede evitar el uso innecesario de terapia antibiótica empírica.

496

INCREMENTO DEL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE LA ENFERMEDAD INVASIVA NEUMOCÓCICA (EIN) EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA. ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD Y APLICACIÓN CLÍNICA DE LA TÉCNICA REAL-TIME PCR

C. Esteva¹, S. Gala², E. Palacín¹, E. Esteban², I. Jordán², S. Hernández-Bou³, A. Gené¹ y C. Muñoz-Almagro¹

¹Servicio de Microbiología, ²Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos, ³Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Sant Joan de Déu, Barcelona.

Introducción: *Streptococcus pneumoniae* (*Spn*) es una de las primeras causa de enfermedad bacteriana en niños. Las técnicas moleculares son herramientas muy útiles para el diagnóstico de patología infecciosa en el paciente pediátrico por su rapidez y bajo volumen de muestra requerido.

Objetivos: 1) Evaluación de una técnica de Real-Time PCR para el diagnóstico rápido de niños con sospecha de enfermedad invasiva neumocócica (EIN). 2) Estudio de especificidad de esta técnica en un grupo control de niños sanos.

Pacientes: Pacientes pediátricos con sospecha clínica de EIN atendidos en el Hospital Universitario de Sant Joan de Déu. Periodo de estudio octubre 2003-diciembre 2005. Como grupo control se extrajeron, previo consentimiento informado, muestras de plasma y de frotis nasofaríngeo de niños sanos que acudieron al laboratorio para análisis preoperatorio por cirugía menor.

Métodos: Las muestras, fundamentalmente plasma, líquido cefalorraquídeo y líquido pleural, se procesaron por cultivo microbiológico tradicional y detección de un fragmento del DNA del gen de la neumolisina (GenBank accesión N° M17717). Como sistema de extracción del DNA se utilizó la resina Chelex-100. Los primers y sonda fluorogénica se diseñaron con el Software Primer Express (Applied Biosystems). Como sistema de amplificación-detección se utilizó el robot Abiprism 7000 (Applied Biosystems). Se realizó una curva de calibración de referencia utilizando diluciones seriadas (0,5 UCF/μl, 2UCF/μl, 8UCF/μl) de una cepa de *Spn* obtenida en nuestro laboratorio. Como control interno se coamplificó 2,5 μl de ADN extraído de esta cepa de *Spn* con 2,5 μl de cada muestra. Las muestras con Ct < 40 ciclos se consideraron positivas.

Resultados: Se diagnosticaron 105 pacientes con EIN. En 96 muestras se realizó en paralelo el cultivo y la PCR, siendo positiva la PCR en 93 (98,6%) y el cultivo en 31 (33,3%). Se incluyeron 106 muestras de plasma del grupo de pacientes control, 50 eran portadores sanos de *Spn* en farínge por cultivo tradicional y 56 no portadores. Todas las muestras excepto 4 (3 de ellas extraídas de portadores sanos) fueron negativas por PCR (especificidad 96,3%). En los cuatro casos la positividad de la PCR se observó en ciclos superiores a 38.

Conclusiones: En nuestra serie, La detección del gen de la neumolisina por Real Time PCR ha mostrado ser una técnica con elevada especificidad en muestra plasmática y contribuye a incrementar el diagnóstico microbiológico de la EIN.

497

UTILIDAD DE LA PCR EN TIEMPO-REAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS VIRALES EN PACIENTES ADULTOS INMUNOSUPRIMIDOS

M. García-Álvarez, M.D. Folgueira, C. Prieto, M.J. Babiano, S. Maldonado y J.R. Otero

Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

Introducción: El diagnóstico precoz de las infecciones respiratorias virales en pacientes inmunosuprimidos es de gran importancia en la práctica clínica. Por ello, nos planteamos como objetivos conocer la incidencia de los virus respiratorios más frecuentes en este tipo de pacientes, incluyendo Metapneumovirus (MPV), y comparar la sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real con el cultivo celular.

Métodos: Se analizaron 217 muestras respiratorias pertenecientes a 146 pacientes inmunosuprimidos (97 pacientes hematológicos y 49 trasplantados de órgano sólido) ingresados en nuestro hospital con infección respiratoria durante el periodo de 1 año. Se realizó cultivo convencional y shell-vial en las líneas celulares A-549, MRC-5 y MDCK investigando mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales la presencia de virus Influenza A y B, Virus respiratorio sincitial (VRS), Parainfluenza 1, 2 y 3, y Adenovirus (Monofluo® Screen, Bio-Rad). El RNA se obtuvo a partir de 140 μl de muestra respiratoria empleando el sistema de extracción QIAamp viral RNA kit. Una vez realizada la retrotranscripción (RT) se investigó la presencia de los virus Influenza A, VRS A, Parainfluenza 3, Rinovirus y MPV mediante una técnica de PCR en tiempo real realizada en el LightCycler versión 2.0 (Roche Molecular Biochemicals) con los siguientes parámetros de amplificación común: 10 min a 95°C y 50 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. El producto de PCR se detectó simultáneamente mediante sondas tipo TaqMan.

Resultados: Mediante el cultivo celular se aisló alguno de los virus estudiados en 17 (7,8%) de las 217 muestras estudiadas (9 Influenza A, 5 Parainfluenza 3, 2 VRS y 1 Picornavirus). Mediante la RT-PCR en tiempo real se detectó alguno de los virus amplificados en 58 (26,7%) muestras (25 Rinovirus, 21 Influenza A, 11 Parainfluenza 3, 2 VRS A y 2 MPV). En 3 casos la RT-PCR detectó infección dual por Rinovirus y otro virus respiratorio.

Conclusiones: Los virus respiratorios que causaron infección más frecuentemente en los pacientes inmunosuprimidos estudiados fueron Rinovirus, Influenza A y Parainfluenza 3, mientras que VRS y MPV presentaron una baja incidencia en esta población. La PCR en tiempo real puede tener un gran impacto en el diagnóstico de las infecciones respiratorias virales en inmunosuprimidos, debido a que es una técnica rápida cuya sensibilidad es mayor que la de los métodos diagnósticos convencionales, permitiendo además la detección de infecciones duales.

498

ESTUDIO DE LA CIRCULACIÓN ACTUAL DE SUBTIPOS DE VIH-1 EN UNA COHORTE PEDIÁTRICA INFECTADA POR EL VIH-1 MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LOS GENES DE LA RETROTRANSCRIPTASA (RT) Y DE LA PROTEASA

C. Polo¹, A. Noguera¹, P. Soler², C. Fortuny¹, C. Figueras², A. Mur³, A. Gómez-Papí⁴, C. Esteva¹, T. Valmaña⁵, F. Bastida⁶, N. Margall⁷, V. Pineda⁸, J. Trapé⁹, T. Coll¹⁰, L. García¹¹ y C. Muñoz-Almagro¹

¹Hospital de Sant Joan de Déu, Barcelona; ²Hospital de la Vall d'Hebrón, Barcelona; ³Hospital del Mar, Barcelona; ⁴Hospital Joan XXIII, Tarragona; ⁵Hospital Arnau de Vilanova, Lleida; ⁶Hospital de Santa Caterina, Girona; ⁷Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ⁸Hospital Parc Taulí, Sabadell; ⁹Hospital de Manresa; ¹⁰Hospital General de Granollers; ¹¹Hospital de Mataró.

Introducción/objetivos: La clasificación filogenética es una aplicación adicional de la secuenciación de los genes re-

lacionados con la resistencia a los fármacos antiretrovirales (ARV). Esta técnica permite detectar el subtipo del VIH-1 y los polimorfismos con implicaciones en la interpretación de las mutaciones de resistencia a los ARV. El objetivo de este estudio es describir la circulación de subtipos del VIH-1 y su variación en el tiempo, en una población pediátrica.

Material y métodos: Se analizaron muestras de plasma procedentes de pacientes pediátricos infectados por el VIH-1 con carga viral detectable (Cobas Amplicor HIV-1 Monitor, Roche), atendidos en once hospitales de Catalunya y remitidas al Hospital Sant Joan de Déu en el periodo 1995-2004. La secuenciación de los genes relacionados con las mutaciones de resistencia a los ARV se realizó con el sistema True Gene HIV-1 Assay (Visible Genetics). Los subtipos se determinaron a través de la base de datos de acceso libre de la Universidad de Stanford.

Resultados: Se incluyeron en el estudio 112 muestras de plasma de 112 pacientes. El subtipo detectado mayoritariamente fue el subtipo B (88,3%); los subtipos no B representaron un 11,7% ($p < 0,05$): subtipos G ($n = 3$), F ($n = 2$), AK ($n = 1$), BF ($n = 1$) y subtipo recombinante CRF-AG ($n = 6$). Dos de los subtipos no B se detectaron en pacientes nacidos en familias autóctonas. Todos los subtipos no B se identificaron en pacientes reclutados a partir del año 1999, observándose un aumento progresivo de estos subtipos en el periodo 2002-2004 (4% vs 17,3%, $p = 0,05$). La proporción de pacientes infectados por subtipos no B en tratamiento TARGA era significativamente menor que la de los pacientes infectados por el subtipo B (5% vs 48%; $p < 0,001$). Asimismo, se observó una elevada presencia de polimorfismos y cambios en posiciones de resistencia en los pacientes naive que presentaban un subtipo no B.

Conclusiones: Se observa un incremento progresivo de los subtipos no B como causantes de infección en los pacientes pediátricos de nuestra área. La presencia de polimorfismos y cambios en posiciones de resistencia en los pacientes naive subtipo no B alerta sobre la necesidad de utilizar bases de datos específicas para la interpretación de las mutaciones de resistencia en estos pacientes. En nuestra serie, hemos detectado un bajo porcentaje de acceso a los tratamientos TARGA en los niños infectados por subtipos no B.

499

DIAGNÓSTICO DE *TROPHYRYMA WHIPPELII* EN PACIENTES CON PROCESOS DIGESTIVOS, ARTICULARES Y NEUROLÓGICOS

S. Melón García, I. de Diego San Miguel, M.C. Galarraga Gay*, D. González Fernández, J.A. Boga Riveiro y F.J. Méndez García
Sección de Virología (Microbiología) del HUCA de Oviedo
y *Servicio de Microbiología del Hospital San Agustín de Avilés

Objetivo: Desarrollar un sistema de detección genómica de *Tropheryma whippelii* y aplicarlo en pacientes con dolencias digestivas, articulares y neurológicas compatibles con la infección bacteriana.

Pacientes y muestras: Entre mayo de 2004 y diciembre de 2005 se enviaron al laboratorio del HUCA 20 muestras (6 sangres periféricas, 4 LCR, 2 biopsias cerebrales, 2 articulares, 4 del tracto digestivo -2 duodeno, 2 yeyuno-, 1 pulmonar y 1 lavado broncoalveolar) de 12 pacientes con signos de una infección por *T. whippelii*.

Métodos: En 5 de las 6 sangres se recogieron polimorfonucleares y plasma para ensayar las PCR, y en otra suero. El ADN total se liberó en las muestras con celularidad (biopsias, polimorfonucleares y lavado) con un tampón de lisis con detergentes y una enzima proteolítica (proteínasa K). El ADN del suero o plasmas se extrajo por un método automático (Ampliprep, Roche). Los LCR se guardaron a 4º hasta la amplificación. Se diseñaron dos tipos de PCR "nested" en un solo tubo, con dos pares de cebadores distintos: uno sobre el fragmento 16s ribosomal y otro sobre el TW391 de la *T. whippelii*. Los perfiles térmicos aplicados fueron idénticos en las dos rondas de amplificación. Los productos amplificados

se pusieron de manifiesto en una electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se secuenciaron para comprobar su similitud con la bacteria.

Resultados: Se encontró ADN de *T. whippelii* en 6 muestras pertenecientes a 3 pacientes distintos: en la biopsia de cerebro de un paciente, en la de duodeno y en el LCR de otro; y en el lavado broncoalveolar, la biopsia pulmonar y una duodenal del tercer paciente. No se encontró ADN bacteriano en ninguna de las muestras de sangre, incluso en una perteneciente al paciente con la biopsia de cerebro positiva. En el tercer paciente se envió una biopsia de yeyuno al año de haber comenzado el tratamiento y resultado ser negativa, evidenciándose una mejoría clínica. Ninguna de las dos amplificaciones genómicas lograron detectar la bacteria en todas las muestras.

Conclusiones: Las técnicas de PCR desarrolladas son útiles para la detección de ADN de *Tropheryma whippelii*, aunque deben combinarse para alcanzar la máxima sensibilidad. Las sangres no resultaron ser una buena muestra para el diagnóstico de la bacteria, y si cualquier tipo de biopsia, el LCR o el lavado broncoalveolar.

500

IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS MOLECULARES DE CLONES PATÓGENOS DE *CAMPYLOBACTER COLI* EN CEPAS DE DIFERENTES ORÍGENES

D. Pérez-Boto¹, J.A. López-Portolés¹, C. Simón¹, F.J. García-Peña², J.C. Abad³ y M.A. Echeita¹

¹Laboratorio de Campylobacter. Servicio de Bacteriología, CNM, IS Carlos III, Majadahonda. Madrid. ²Laboratorio de Campylobacter, Laboratorio Central de Veterinaria, MAPYA. Algete. Madrid. ³Cobb Española, S.A. Alcalá de Henares, Madrid.

Introducción: Las campilobacteriosis son las gastroenteritis bacterianas más frecuentes en los países industrializados. La principal especie implicada es *Campylobacter jejuni*, siendo *Campylobacter coli* la segunda especie en importancia y su principal fuente de infección la carne de cerdo. En general, *Campylobacter* presenta una alta variabilidad genética, debido a procesos de reordenamiento genético y transferencia de genes. Estudios recientes han mostrado que *C. coli* posee una menor estructura clonal que *C. jejuni*.

Objetivo: Detección e identificación de clones patógenos, genéticamente estables, en *C. coli*.

Material y métodos: Se analizaron 35 cepas de *C. coli* de diversos orígenes (aves, agua de granjas avícolas y origen humano) que poseían el mismo patrón de RFLP-PCR para el gen *flaA*: F36. En estas cepas se realizó PFGE usando la enzima *SmaI*. Además se amplificaron por PCR y se secuenciaron los 7 genes "housekeeping" que se usan en la técnica de MLST. Se analizaron también algunas cepas de *C. jejuni* que poseían el mismo patrón de RFLP-PCR para el gen *flaA*. Se estudió la semejanza de los patrones obtenidos por PFGE mediante el algoritmo de Dice y se construyó el dendrograma de las cepas mediante UPGMA (Tol. 2%).

Resultados: Entre las cepas de *C. coli* se obtuvieron 2 clusters con un 93% y un 91, 30% de semejanza entre ellas. En total, entre las cepas de *C. coli* F36, la menor semejanza fue del 70,85%. Las cepas de *C. jejuni* F36 tenían una semejanza sólo del 37, 33% con respecto a las cepas de *C. coli*. Las cepas pertenecientes a un mismo cluster poseían los mismos alelos en la tipificación por MLST, evidenciando un origen clonal común.

Conclusiones: Se observa la presencia de al menos 2 clones de *C. coli* en cepas de diferentes orígenes, sin aparente relación epidemiológica entre ellas. Estos clones, genéticamente estables, son patógenos para el hombre, habiéndose también aislado de una fuente de infección (aves) que no es la principal para esta especie. El tipo RFLP-PCR F36 no sería exclusivo de *C. coli*, ya que aparece también en *C. jejuni*, evidenciando posibles procesos de transferencia horizontal de genes intraespecíficos.