

Sesión 2

Aspectos microbiológicos y clínicos de las infecciones víricas (no VIH) (I)

017

DETECCIÓN Y GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO MEDIANTE PCR E HIBRIDACIÓN CON ARRAYS DE BAJA DENSIDAD

E. Caballero¹, G. Codina¹, T. Tórtola¹, C. Centeno², J.V. Abal² y J. Xercavins²

¹S. Microbiología, ²S. Ginecología. H. Vall d'Hebron de Barcelona.

Introducción: La infección cervical por genotipos de alto riesgo oncogénico del virus del papiloma humano (VPH) es un evento precursor del cáncer cervical. Su detección e identificación precoces y el consecuente tratamiento temprano de las lesiones precancerosas puede evitar la progresión de la enfermedad.

Objetivo: Valorar una nueva técnica de genotipado del VPH en muestras endocervicales mediante amplificación por PCR e hibridación mediante arrays de baja densidad (PCR-ARRAYS) que permite identificar 35 genotipos distintos.

Material y métodos: Se han analizado 176 muestras endocervicales (32 ASCUS, 80 SILBG/CIN I, 62 SILAG/CIN II-III y 2 carcinoma cervical) identificadas como positivas para VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) por Hibridación Líquida (HL) (Hybrid Capture II, Digene). Todas las muestras se genotiparon por PCR-ARRAYS (Clinical Arrays PVH, Genómica), 81 lo fueron también por PCR-RFLP.

Resultados: Por PCR-ARRAYS fue posible detectar y genotipar 163 (92%) de las 176 muestras analizadas, identificando uno o más genotipos de VPH-AR en el 85% de ellas. El genotipo 16, sólo o en infección múltiple se detectó en el 36%. El rendimiento de la PCR-RFLP fue del 76% identificando uno o más genotipos de VPH-AR en el 66%. En las 127 muestras en las que por HL se había detectado sólo VPH-AR, por PCR-ARRAYS se identificó un único tipo de VPH-AR en 91 casos (71%), e infección múltiple en 22 (17%). De las 64 muestras analizadas por PCR-RFLP, se identificó un único

tipo de VPH-AR en 43 (67%) e infección múltiple en 5 casos (8%).

Por HL se había detectado infección mixta por VPH-AR y VPH de bajo riesgo (VPH-BR) en las restantes 49 muestras. De ellas, por PCR-Arrays se identificaron 36 (73%) infecciones múltiples aunque en 11 (22%) y 8 (16%) sólo se identificaron genotipos de alto o bajo riesgo, respectivamente. De las 17 muestras analizadas por PCR-RFLP sólo en 4 (23%) se identificó más de un genotipo.

Conclusiones: 1. La técnica de PCR-ARRAYS tiene mejor rendimiento ya que se genotiparon el 92% de las muestras, frente al 76% por PCR-RFLP. 2. La técnica de PCR-ARRAYS identifica mayor número de infecciones múltiples que la técnica de PCR-RFLP tanto en muestras con resultado positivo únicamente para VPH-AR por HL (17% vs. 8%) como en muestras con resultado positivo para VPH-AR y VPH-BR por HL (75% vs. 23%).

018

FRECUENTE DETECCIÓN DE VIRUS RESPIRATORIOS EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS CON NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

M. Camps¹, M.A. Marcos¹, T. Pumarola¹, C. Cervera², L. Linares², R. Perelló², A. Moreno², C. Uriburu³, M. Rovira³, C. Agustí⁴, A. Torres⁴ y M.T. Jiménez de Anta¹

¹Servicio de Microbiología, ²Enfermedades Infecciosas, ³Hematología, ⁴Servicio de Neumología. Hospital Clínico de Barcelona. IDIBAPS. Universidad de Barcelona.

Objetivo: Estudiar la incidencia de virus respiratorios en pacientes inmunodeprimidos con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Valorar el rendimiento de la técnica de PCR respecto a los métodos convencionales en el diagnóstico de los virus respiratorios.

Material y métodos: Desde enero del 2004 hasta enero del 2006, se incluyeron pacientes adultos con criterios de inmunosupresión (VIH, transplantados, tratamiento con corticoides sistémicos, neoplasias) y diagnosticados de NAC. En el laboratorio de Microbiología se realizaron para el estudio de bacterias: dos hemocultivos, cultivo de una muestra respiratoria y antigenúria de *S. pneumoniae* y *Legionella pneumophila*. Para el estudio de virus respiratorios se recogieron un frotis nasal y otro faríngeo, y se realizaron las técnicas siguientes: inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales para la detección del virus de la gripe A (VGA) y B (VGB), parainfluenza 1, 2 y 3, adenovirus y virus respiratorio sincitial y cultivo celular en las líneas celulares MDCK y Hep-2 para los virus anteriormente comentados. La misma muestra se utilizó para 2 PCR independientes con retro-transcripción (RT-PCR) múltiple "nested", por un lado para los virus de la gripe A, B y C, adenovirus y virus respiratorio sincitial A y B; y por el otro lado para los virus parainfluenza 1, 2, 3 y 4, Coronavirus229E, CoronavirusOC43, enterovirus y rinovirus.

Resultados: Durante este período se han incluido 108 pacientes inmunodeprimidos con NAC, 72 hombres (67%) y 36 mujeres (33%) con una edad media de 55 años. En 77 de los pacientes (71%) se obtuvo un diagnóstico etiológico, de los cuales se detectó *S. pneumoniae* en 34 pacientes (44%) y en 30 pacientes (39%) estuvo implicado un virus respiratorio. Un 64% de las infecciones víricas han sido causadas exclusivamente por un virus, siendo el VGA el más frecuente y un 36% por la coinfección de un virus y una bacteria, siendo en éste caso el rinovirus el más numeroso. El mayor rendimiento en la detección de los virus respiratorios se obtuvo con la PCR, 30/32 (94%) de los virus; el cultivo celular aisló 8/32 (25%) y la inmunofluorescencia detectó 3/32 (16%).

Conclusión: Los virus respiratorios son agentes etiológicos muy frecuentes en pacientes inmunodeprimidos con NAC. La PCR es un método sensible que puede ser muy útil en el diagnóstico rápido de los virus respiratorios.

019

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PHLEBOVIRUS: DESCRIPCIÓN DEL GENOTIPO ESPAÑOL E ITALIANO DEL VIRUS TOSCANA

X. Collao^{1,2}, M.P. Sánchez-Seco^{1,3}, L. Hernández¹, S. Sambombatsu⁴, J.M. Navarro⁴, C. Aranda⁵, R. Molina⁶ y A. Tenorio¹

¹Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas importadas. Centro Nacional de Microbiología (CNM). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Madrid, ²Universidad de Valparaíso. Chile, ³Unidad de Alertas y Emergencias. CNM. ISCIII, ⁴Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada, ⁵Servicio de Control de Mosquitos del Baix Llobregat. Barcelona, ⁶Servicio de Parasitología. CNM. ISCIII.

Introducción: El género *Phlebovirus* (Bunyaviridae) está compuesto por arbovirus agrupados en 68 serotipos diferentes que se distribuyen por todo el mundo. En él hay patógenos tan importantes como el Virus de la Fiebre del Valle del Rift (asociado a cuadros neurológicos con manifestaciones hemorrágicas), el virus Toscana (TOSV) que produce meningitis linfocitaria aguda (MLA), o los virus Nápoles y Sicilia que causan un cuadro febril conocido como “fiebre de los flebotomos”.

TOSV está presente en España, Italia y otros países del mediterráneo, donde existen los vectores adecuados para la circulación de éste y otros *phlebovirus*.

Objetivo: Caracterizar molecularmente el virus Toscana circulante en España; buscar y caracterizar otros posibles *phlebovirus* circulantes y obtener mayor información a nivel molecular de algunos miembros de este género.

Metodología: Se utilizó un método de amplificación genérica diseñado en el gen de la polimerasa para la detección de *phlebovirus* cuya identificación se realizó mediante secuenciación del fragmento amplificado. La búsqueda de *phlebovirus* se realizó en vectores capturados en diferentes puntos de Baleares, Cataluña y Andalucía y en el LCR de pacientes con MLA. Para obtener mayor información a nivel molecular de TOSV se obtuvieron secuencias de otros genes virales (fragmentos S y M).

Resultados y discusión: Se detectaron *phlebovirus* en 28 pools de flebotomos capturados en Granada, Barcelona y Baleares. Se identificó TOSV en flebotomos circulantes en Granada y en el LCR de pacientes con MLA. El análisis del gen de la proteína N demostró que existían grandes diferencias a nivel de nucleótido entre TOSV italianos y españoles. Se detectaron también dos grupos de secuencias no descritas previamente. Uno de ellos, en flebotomos de Barcelona, Granada y Baleares, y el otro en flebotomos de Granada.

Conclusión: Según las diferencias genómicas encontradas, se pueden establecer dos linajes distintos de TOSV (español e italiano). En España circulan *phlebovirus* no descritos hasta el momento, uno de ellos de amplia distribución geográfica (Barcelona, Granada y Baleares) que se agrupa con los virus Nápoles y TOSV. El otro, compuesto por secuencias de flebotomos de Granada se asemeja a otros virus para los que no se ha descrito implicación en patología humana.

020

DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIRAL Y PARASITARIO DE LAS INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

L. Villa Bajo, S. Melón García, M.E. Álvarez Argüelles, D. González Fernández, C. Díaz Carrió y M. de Oña Navarro
Sección de Virología (Microbiología) del HUCA, Oviedo.

Objetivos: Analizar los resultados obtenidos en los 12 últimos años con la aplicación de técnicas de amplificación genómica en la detección de virus y *Toxoplasma gondii* implicados en infecciones del sistema nervioso central.

Material y métodos: Entre 1994 y 2005 se realizó una amplificación genómica (PCR “nested” o RT-PCR “nested”) frente a virus Herpes Simplex tipos 1 y 2 -VHS1, VHS2-, VaricellaZoster -VZV-, virus JC, *Toxoplasma gondii* (desde 1994), Citomegalovirus -CMV-, virus EpsteinBarr -VEB-, Enterovirus, virus Herpes Humanos tipos 6 y 7-VHH6, VHH7- (desde 1997), y virus Herpes Humano 8 -VHH8-, Adenovirus (desde 2000), a 3763 LCR pertenecientes a 3511 pacientes (2176 niños y 1335 adultos), según protocolos clásicos y desarrollados en el laboratorio.

Resultados: En 770 (21,7%) de los pacientes se detectó algún virus y en 9 *T. gondii*. De ellos 535 eran niños y 235 adultos. El porcentaje de niños en los que se detectó algún microorganismo fue del 24,59% y en adultos del 17,53% (p < 0,001). A lo largo de estos 12 años, se detectó genoma viral en el 15-20% de los pacientes en los que se procesó una muestra de LCR y en los que se sospechaba una infección del SNC. De los 126 LCR recibidos en 1995 se pasó a 510 en el 2005. Hasta 1998, el número de muestras de pacientes adultos era similar al de niños (110 y 105 respectivamente), pero a partir de ese año, las peticiones en niños se duplican y superan a las de adultos al incorporar el Enterovirus en la batería diagnóstica. En el año 2000 se detecta un pico de detección debido a una epidemia por Enterovirus. En general, el Enterovirus fue el agente más frecuente (73,6%) seguido del VHS1 (14,17%) y en menor medida el EBV (2,99%), CMV, VZV, VHS2, VHH6, VHH7, *T. gondii* (entre 1-2%) y Adenovirus (0,13%). Mientras que en niños el Enterovirus supone el 88,4% de las detecciones y el VHS1 el 6,7%, en adultos representan el 39,7% y el 32,4% respectivamente (p < 0,001).

Conclusiones: Durante el periodo de estudio, el diagnóstico de una infección vírica o parasitaria en el SNC llegó a cotas del 25%, observándose picos en los años 2000 y 2001, debido a brotes por Enterovirus. Existe una clara diferencia entre adultos y niños en la etiología de dichas infecciones: mientras que en niños se encuentra mayoritariamente el Enterovirus, en adultos también hay que buscar virus del grupo herpes fundamentalmente.

021

UTILIDAD DE LA RT-PCR DENTRO DEL SISTEMA DE VIGILANCIA DE GRIPE EN ANDALUCÍA

R. Yeste, M. Pérez-Ruiz, M.J. Ruiz-Pérez, G. Reina, J.D. Turiño, M.A. Rivera, F. García-Maldonado y J.M. Navarro
Servicio de Microbiología. H.U. Virgen de las Nieves. Granada.

Dentro del Grupo de Vigilancia de Gripe en España, la técnica de referencia para diagnóstico virológico es el cultivo viral e identificación mediante inmunofluorescencia. La RT-PCR ha demostrado ser más sensible, y podría ser una alternativa a la inmunofluorescencia para detectar virus en cultivo. Además permitiría simultáneamente conocer el tipo y subtipo viral, y obtener la cepa para su posterior caracterización. Hemos comparado la sensibilidad de la RT-PCR en la detección de virus de la gripe, cuando se realiza de muestra directa o de sobrenadante de cultivo viral; así como el rendimiento de la RT-PCR para identificación de virus gripales a partir de cultivo viral con respecto a técnicas de inmunofluorescencia. Se utilizaron 299 exudados nasofaríngeos en medio de transporte de virus, enviados a nuestro laboratorio por los médicos de la red de vigilancia de gripe en Andalucía durante la temporada 2004-2005. Se compararon tres métodos: 1. Método MD, RT-PCR de muestra directa; 2. Método SV-IFD, cultivo mediante técnica de shell-vial (SV) + inmunofluorescencia directa (IFD) sobre la monocapa y 3. Método SV-PCR, SV + RT-PCR de sobrenadante del cultivo. Para ello, una alícuota de 140 µL de la muestra se procesó para extracción de ARN y RT-PCR, y el resto (200 µL/tubo) se inoculó en dos tubos con células MDCK, para SV. A las 48 h, 140 µL del sobrenadante se procesaron para RT-PCR, y sobre la monocapa celular se realizó IFD con anticuerpos

monoclonales (IMAGEN® Influenza virus A and B, Dako). El diagnóstico molecular se basó en una RT-nested-PCR múltiple (gen de la hemaglutinina) para detección de virus de la gripe y diferenciación en tipos y subtipos H1 y H3. Se detectó virus de la gripe en 106 (35,4%) muestras por alguno de los tres métodos, 85 (80,2%) gripe A H3 y 21 (19,8%) gripe B. No se detectó gripe A H1. La sensibilidad de los métodos fue de 82% (87 positivos) para el método MD; 69,8% (74 positivos) para el método SV-IFD; y 95,3% (101 positivos) para el método SV-PCR. La concordancia entre los métodos en la detección de virus fue del 56,6% entre los métodos MD y SV-IFD; 77,3% entre los métodos MD y SV-PCR; y del 69,8% entre los métodos SV-IFD y SV-PCR. La RT-PCR a partir de sobrenadante de cultivo fue la técnica más sensible, por lo que se podría considerar una alternativa para utilizar en los sistemas de vigilancia, en los cuales se precisa el cultivo para la caracterización de las cepas circulantes en cada temporada.

022

RENDIMIENTO DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE INFECCIONES DEL SNC POR VIRUS HERPES SIMPLEX Y VARICELA ZOSTER

J.D. Turiño, G. Reina, M. Pérez-Ruiz, C. Liébana, J.M. Navarro, A. Sanpedro y M. de la Rosa

Servicio de Microbiología. H.U. Virgen de las Nieves. Granada.

La introducción de las técnicas de PCR ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de infección del SNC por virus herpes, considerándose hoy día la técnica de referencia a partir de muestras de LCR.

Objetivos: Evaluar la utilidad de la PCR en tiempo real (PCR-TR) para diagnóstico de infección del SNC por virus herpes simplex (VHS) y varicela zoster (VVZ), y analizar las características clínicas y analíticas de los pacientes con diagnóstico confirmado de infección por estos virus.

Métodos: Se procesaron para PCR-TR de VHS y VVZ los LCRs con petición de "PCR herpes". Tras extracción del ADN viral (columnas de Qiagen), la PCR-TR se realizó en LightCycler (Roche) y por cada muestra se efectuaron dos reacciones en capilares separados, una para VHS 1 y 2 (kit comercial LC HSV 1/2 [Roche]), y la otra para VVZ, utilizando un protocolo optimizado en el laboratorio, de forma que VHS y VVZ se pudieran detectar simultáneamente. Los resultados positivos se confirmaron repitiendo la técnica, y por duplicado. Se recogieron los datos microbiológicos, clínicos y analíticos de los pacientes con PCR positiva durante el periodo octubre 2003-diciembre 2005.

Resultados: Se procesaron 250 peticiones para "PCR herpes", de las cuales 16 fueron positivas (6,4%), 7 VHS-1 y 9 VVZ. No se detectó ningún VHS-2. Todos los resultados preliminares positivos se confirmaron en la repetición. Se recuperaron las historias clínicas de 13 de los 16 casos con virus herpes: 6 VHS-1 y 7 VVZ. El rango de edad osciló entre 5 meses y 87 años (mediana = 61). El 69% fueron mujeres. La glucosa en LCR fue normal en todos los casos, y en 12 hubo pleocitosis. Las diferencias más significativas en los datos analíticos y clínicos entre los casos de VHS y VVZ, respectivamente fueron: % linfocitos, $66 \pm 21,2$ y $95,3 \pm 3,4$; proteínas (mg/dL), $70,5 \pm 27$ y 123 ± 52 ; convulsiones en el 67% y 0%; fiebre en el 100% y 28%; y lesiones en TAC en el 83% y 0% de los casos. De los 7 casos con VVZ en LCR, el diagnóstico fue de meningitis en 4 casos (57%) y de encefalitis en el resto, y 4 (57%) presentaron lesiones cutáneas compatibles con herpes zoster.

Conclusiones: En nuestro medio, VVZ debe ser incluido entre los agentes a investigar en los pacientes con sospecha de infección del SNC de etiología viral. El protocolo de PCR-TR diseñado se mostró eficaz y rápido para la detección de VHS y VVZ de forma simultánea.

023

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENOTIPOS A Y B DE METAPNEUMOVIRUS EN GUIPÚZCOA

D. Vicente, M. Montes, J.M. Marimón, M. Ercibengoa y G. Cilla
Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián.

Introducción: El metapneumovirus humano (hMPV) causa infección del tracto respiratorio superior e inferior en niños y adultos. Los estudios genéticos muestran la existencia de dos genotipos de hMPV (A y B), con al menos dos genosubtipos en cada uno de ellos. La epidemiología de las infecciones causadas por ambos genotipos es desigual y se ha sugerido una mayor gravedad de las infecciones causadas por hMPV genotipo A. En el momento actual el genotipado se efectúa mediante secuenciación, técnica laboriosa y costosa que no está disponible en muchos laboratorios. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método rápido de PCR-RFLP para identificación de los genotipos A y B de hMPV.

Método: Entre las más de 100 muestras que resultaron positivas a hMPV en nuestro laboratorio en los últimos 4 años, se seleccionaron 20 para el presente estudio (15 muestras respiratorias directas y 5 sobrenadantes de cultivo celular). Diecisiete pertenecieron al genotipo A y 3 al genotipo B (determinación realizada mediante amplificación y secuenciación de un fragmento del gen de la proteína de fusión (F), ABI PRISM 3100). Para la PCR-RFLP se amplificó el mismo fragmento del gen F (450 bp) tras extracción del RNA viral a partir de la muestra respiratoria o de sobrenadante de cultivo celular. Cinco microlitros del producto amplificado fueron digeridos con 30 UI de los enzimas BsaI y AlwI a 50°C durante 1 hora y posteriormente se visualizaron los fragmentos en gel de agarosa al 2%.

Resultados: En las 20 muestras se amplificó el fragmento de 450 bp. La digestión con BsaI produjo dos fragmentos de 320 y 120 bp en las 17 muestras con detección de hMPV genotipo A, y no cortó el fragmento de las 3 muestras con hMPV genotipo B. La digestión con AlwI produjo 4 fragmentos (270, 90, 60 y 30 bp) en las 3 muestras hMPV genotipo B y no cortó las del genotipo A. Este método no permitió identificar los genosubtipos hasta ahora conocidos del virus.

Conclusiones: La PCR-RFLP es un método sencillo, más rápido y barato que la secuenciación para identificar los genotipos A y B de HMPV en muestras clínicas y sobrenadantes de cultivo celular.

024

COMPARACIÓN ENTRE LA DETECCIÓN DEL GEN DE LA POLIMERASA Y EL GEN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN EN LA INFECCIÓN POR METAPNEUMOVIRUS HUMANO

M. Montes, D. Vicente, J. Mendiola, E. Tamayo y G. Cilla
Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián.

Metapneumovirus humano (hMPV) es uno de los virus causantes de infección respiratoria aguda (IRA) en niños y adultos. Su frecuencia es similar a la de otros virus respiratorios. Hasta diciembre de 2005 se han detectado más de 100 episodios de hMPV en nuestro laboratorio. Al replicarse el hMPV con dificultad en las líneas celulares habitualmente empleadas, el diagnóstico se basa fundamentalmente en métodos moleculares. En el presente trabajo comparamos dos PCR referidas en la literatura para la detección de hMPV: PCR a tiempo real de la polimerasa (L) y PCR convencional de la proteína de fusión (F).

Material y métodos: Para este estudio comparativo se han incluido 118 muestras respiratorias y 40 sobrenadantes de cultivo celular (shell-vial, LLC-MK2) procesados en el laboratorio durante los meses de abril-junio de 2004. Para detectar hMPV se estudió la presencia de dos genes: gen L me-

dianete una PCR a tiempo real (van den Hoogen B.G. et al *J Infect Dis* 2003; 188:1571-1577) y el gen F (Peret TC, et al. *J Infect Dis* 2002;185:1660-3.) mediante una PCR convencional obteniéndose un amplificado de 450bp.

Resultados: En el estudio sobre muestra directa 21 muestras resultaron positivas (21/118, 17,8%). El gen L se detectó en 20 representando el 16,9% de las muestras respiratorias directa estudiadas y el gen de la proteína F en 12 representando el 10,2%, $P = 0,02$. En una muestra se detectó sólo el gen F y en 9 se sólo se detectó el gen L. El estudio molecular de los dos genes a partir de cultivos celulares fue similar, detectándose 4 cultivos positivos para ambos genes.

Conclusiones: La PCR a tiempo real para detectar el gen de la polimerasa en muestras clínicas directas fue más sensible que la PCR convencional para detectar el gen de la proteína de fusión. En nuestra experiencia el enriquecimiento previo en cultivo celular no aporta la mayor sensibilidad descrita por algunos autores (Chan PKS et al. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1058-63).

025

HERPESVIRUS Y RETROVIRUS ENDÓGENO EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM): NIVELES DE ANTICUERPOS, DETECCIÓN Y CARGA VIRAL DE VHH6, EBV Y MRSV

A. Rodríguez¹, M. Rubio¹, P. Villoslada², M. Riverol², J. Sepulcre², A. Uccelli³, S. Sotgiu⁴, L. Brieva⁵ y M. Fernández-Alonso¹

¹Servicio de Microbiología Clínica y ²Departamento de Neurología. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona, ³Departamento de Neurología. Universidad de Génova. Génova, ⁴Departamento de Neurología. Universidad de Sassari. Sassari, ⁵Servicio de Neurología. Hospital Arnau de Vilanova. Lleida.

Introducción: La EM es una enfermedad de origen multifactorial. Diversos autores apoyan el papel de agentes infecciosos en su patogenia.

Objetivos: Estudiar la asociación entre la respuesta inmune frente al Virus de Epstein Barr (VEB) y al Herpes Humano tipo 6 (VHH6), la presencia o ausencia de virus libre (VEB y VHH6) y la carga viral de MRSV con EM, así como la asociación del riesgo de padecer EM o la modificación del curso clínico con dichos parámetros.

Material y métodos: Se estudiaron 171 pacientes con EM (106M/64H/1desconocido; edad: 39,1 +/- 9,7 años; EDSS: 3,186 (0-8,5); 18CIS (primer brote), 92RR (remite-recurrente activa), 32SP (secundariamente progresiva), 17PP (primariamente progresiva), 9PR (progresiva recurrente), 3 sin grupo y 85 CS (control sano) (47M/38H; edad: 38,8 ± 12,9 años) pareados por edad y sexo. Se analizó la presencia de DNA de VHH6 y EBV libre en suero mediante PCR múltiple cualitativa, la presencia de ARN de MRSV en plasma mediante RT-PCR y el número de copias de dichos virus por PCR en tiempo real. Se determinaron anticuerpos anti-HHV6 IgM y anti-EBNA VEB IgG en suero mediante enzimoinmunoensayo (EIA). El análisis estadístico se realizó empleando el test T para comparar casos y controles y ANOVA para las diferencias entre grupos.

Resultados: Encontramos títulos mayores de anticuerpos frente a EBV en pacientes CIS o RR que en CS ($p < 0,01$) y entre RR y formas progresivas ($p < 0,05$), mientras que el riesgo de padecer EM teniendo un resultado negativo para anticuerpos frente al virus EBV es muy bajo (OR de 9,8). No encontramos diferencias significativas entre las formas progresivas entre si o con respecto a CS en los títulos de anticuerpos frente a VEB. Encontramos correlación entre los títulos frente a EBV y EDSS ($R = -0,236$; $p = 0,002$), y entre los títulos frente a EBV y frente a VHH6 ($R = 0,269$; $p < 0,001$). Se ha detectado DNA de HHV6 en suero de un paciente con primer brote. Aunque no hubo diferencias significativas en positividad o títulos de anti-VHH6 o presencia o carga viral

de MRSV entre pacientes y CS, los pacientes con EM en brotes tenían títulos mayores de anti-VHH6 que CS ($p = 0,033$).

Conclusiones: La EM se asocia con mayor respuesta inmune contra herpesvirus, especialmente contra el VEB, pero también contra VHH6 en las fases iniciales de la enfermedad, lo cual sugiere que los herpesvirus participan en la patogenia de esta enfermedad (Proy Invest. Dpto Salud. Gob de Navarra. Ref 55/2003).

026

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PARÁLISIS FACIAL PERIFÉRICA

M.E. Álvarez Argüelles¹, A. Morilla Morilla¹, R. Cimadevilla Suárez¹, L. Villa Bajo¹, L. Barreiro Hurlé² y M. Rodríguez Pérez¹
¹Servicio de Microbiología I. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Oviedo, ²Servicio de Microbiología. Hospital Carmen y Severo Ochoa. Cangas de Narcea.

Introducción: El virus del herpes simplex (VHS) y el virus varicela-zoster (VVZ) son, probablemente, la causa más frecuente de parálisis facial periférica (PFP). La infección por VHS-1 parece ser responsable de parte de los casos de parálisis de Bell, hasta ahora considerada idiopática. La parálisis producida por VVZ es menos frecuente, y puede ir acompañada de un zoster ótico (síndrome de Ramsay Hunt) o presentarse sin lesiones cutáneas (zoster "sine herpete"), en cuyo caso resulta imposible de diferenciar de la parálisis de Bell.

Material y métodos: Se incluyeron en el estudio 323 sueros, pertenecientes a 294 pacientes diagnosticados de PFP en HUCA entre 2001 y 2005. Se investigó la existencia de anticuerpos frente a los microorganismos que con mayor frecuencia producen PFP: VHS, VVZ y virus de la parotiditis por técnica de EIA (Enzignost, Behring) y *Borrelia burgdorferi* por ELFA (VIDAS) e inmunotransferencia (Virotech). En el caso de los virus se consideró diagnóstica la presencia de IgM o una variación significativa en la cantidad de IgG en 2 muestras recogidas con 3 semanas de intervalo, y en el de *B. burgdorferi* la detección de anticuerpos específicos por Western blot. Además, se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes con serología positiva y se recogieron los datos demográficos, clínicos y microbiológicos.

Resultados: Los resultados de la serología permitieron relacionar la PFP con un patógeno determinado en 41 pacientes (14%): 30 (73%) VVZ (11 síndromes de Ramsay Hunt y 19 herpes zoster "sine herpete"), 6 (15%) VHS y 5 (12%) *B. burgdorferi*. En el caso de VHS y VVZ, en 29 pacientes se encontraron IgM y en 7 variación significativa de las IgG. La media de edad fue de 46 años (rango 6-92), el 73% eran mujeres. En 20 casos la parálisis se presentó de forma súbita y en 14 de forma progresiva (7 no consta). 30 pacientes fueron tratados con corticoides y 9 (todos ellos con VVZ) con antivirales. La recuperación fue completa en 22 pacientes y parcial en 7 (12 no consta).

Conclusiones: El VVZ fue la causa más frecuente de PFP en nuestra serie. El estudio de dos muestras de suero en paralelo permitió diagnosticar un 20% de casos en los que la IgM era negativa, lo que resalta la importancia de disponer de una segunda muestra.

027

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS DE ORIGEN VÍRICO EN LA POBLACIÓN PEDIÁTRICA DE GRAN CANARIA

F. Artilés¹, M.C. Pérez¹, A. Caballero² y M.J. Pena¹

¹Servicio de Microbiología, ²Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.

Introducción: Las infecciones respiratorias agudas (IRA) de origen vírico son una causa frecuente de consulta y hospitalización pediátrica. Los objetivos de este estudio fueron:

a) conocer la etiología de dichas infecciones en la isla de Gran Canaria y b) conocer la rentabilidad diagnóstica de la inmunofluorescencia (IF) comparada con el cultivo celular (CC).

Métodos: Durante tres años (junio de 2002 a mayo de 2005) se recogieron 1957 lavados nasofaríngeos de 1729 niños atendidos en Urgencias con síntomas compatibles con IRA. En pacientes con más de una muestra sólo se consideró para el estudio la primera muestra. En todas las muestras se realizó una técnica rápida de detección de antígeno de virus respiratorio sincitial (VRS). En las muestras con resultado negativo se realizó IF para la detección de VRS, virus Parainfluenza (VPI), virus Influenza (VI), Adenovirus (AV) y Coronavirus (CoV); CC convencional (MRC-5 y HEp-2) para la detección de Enterovirus (EV) y Rhinovirus (RV); y CC por "shell vial" (HEp-2, LLC-MK2 y MDCK). La identificación se llevó a cabo por la observación de efecto citopático característico y/o IF.

Resultados: La mediana de edad fue de 2 meses (intervalo: 0,03-119). Se identificó el agente causal del cuadro respiratorio en 1032 niños (59,7%). El VRS se detectó en 769 niños (74,5%). Los demás virus identificados, por orden de frecuencia, fueron: VPI (104, 10,1%), RV (65, 6,3%), AV (44, 4,3%), VI (31, 3,0%), EV (15, 1,4%) y CoV (4, 0,4%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el sexo, pero sí entre la edad y el tipo de virus detectado: los AV fueron responsables de cuadros en niños de mayor edad (mediana: 6 meses; intervalo: 1-74). Hubo 6 casos de infección mixta. La sensibilidad de la IF en relación con el CC fue del 65,9%, y la especificidad del 95,6%.

Conclusiones: Los virus respiratorios son responsables de un alto número de casos de IRA, principalmente el VRS. Las IRA producidas por AV ocurren en niños más mayores que las debidas a otros virus. El diagnóstico etiológico es determinante en el manejo clínico de los pacientes y en el empleo adecuado de antibacterianos y antivirales.

028

CARACTERIZACIÓN DE SÍNDROMES NO NEUROLÓGICOS CAUSADOS POR ENTEROVIRUS

G. Reina¹, J.D. Turiño¹, M. Pérez-Ruiz¹, A. Avellón², A. Otero², G. Trallero² y J.M. Navarro¹

¹Servicio Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada), ²Laboratorio Enterovirus. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

Introducción: Los enterovirus son un grupo de microorganismos muy implicados en infecciones del SNC (parálisis flácida, meningitis). Sin embargo, también constituyen uno de los principales agentes etiológicos de síndromes más leves, pudiendo ser causa de hasta el 70% de los síndromes febriles sin foco en niños durante verano y otoño.

Material y métodos: Se han recogido los datos de 34 enterovirus aislados en nuestro laboratorio entre enero de 1988 y enero de 2006. Éstos procedían de 37 muestras (20 lavados nasofaríngeos, 9 exudados faringoamigdalares, 6 heces y 2 muestras genitales) de 34 pacientes con procesos clínicos diversos. El diagnóstico se realizó mediante cultivo celular, el procesamiento de las muestras respiratorias incluía un cultivo en shell-vial de las líneas MDCK, LLC-MK2 y Hep-2, además de un tubo tradicional de MRC-5 donde se detectaba el crecimiento del enterovirus. El resto de muestras se inoculaban en las siguientes líneas celulares: RD, MRC-5, Vero y Hep-2. Tras la detección del efecto citopático, la identificación se realizó mediante pruebas físico-químicas (cloriformo y pH ácido) o inmunofluorescencia indirecta. Posteriormente el serotipo se realizó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, neutralización o secuenciación del fragmento 3' del gen VP1.

Resultados: De los 34 casos descritos, sólo 6 se presentaron en adultos, mientras que los restantes 28 correspondieron a

pacientes menores de 6 años (22 en menores de 2 años). El 76,5% de estos cuadros no neurológicos fueron síndromes febriles o respiratorios, mientras que luego aparecieron en menor medida otros cuadros, como los exantemáticos (14,7%). Además el 73,1% de esos síndromes febriles y respiratorios se produjeron en pacientes ≤ 1 año. Los serotipos de enterovirus detectados en estos cuadros clínicos fueron muy diversos: 4 Cocksackiae B1 (CB1); ECHO 30 (E30), E7 y Polio 1 fueron aislados tres veces cada uno, y además aparecieron serotipos menos frecuentes como E13, E17, CB2, E3 e incluso, recientemente, Enterovirus 75.

Conclusiones: Los síndromes febriles y catarrales por enterovirus son infecciones muy frecuentes particularmente en niños menores de un año. Se observa la aparición en nuestro medio de serotipos nuevos como el Enterovirus 75 causando este tipo de cuadros no neurológicos.

029

ENCEFALITIS HERPÉTICA. SERIE CLÍNICA DE 10 CASOS

J.D. Ruiz-Mesa, A. Plata¹, L. Mérida, B. Sobrino Díaz¹, M. Delgado, L. Valiente de Santis¹, A. del Arco y J. de la Torre
Unidad de Medicina Interna. Hospital Costa del Sol. Marbella (Málaga), ¹Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos Haya. Málaga.

Objetivo: Analizar las características epidemiológicas, clínicas, diagnósticas y evolutivas de la encefalitis herpética (EH).

Pacientes y métodos: Estudio retrospectivo descriptivo, realizado en 2 centros hospitalarios de Málaga (H. Carlos Haya y H. Costa del Sol), en un periodo de 6 años (2000-2005). Se incluyeron aquellos pacientes que presentaron PCR positiva a VHS en LCR, o bien cuadro clínico compatible junto con técnica de imagen y/o EEG compatible. Programa estadístico con SPSS 12.0.

Resultados: Durante el periodo estudiado se incluyeron 10 casos de EH, de los cuales el 50% eran varones. La edad media fue de 59,20 años + 18,4, con un rango de 19 a 78 años. Como antecedentes destacaron alcoholismo (20%), diabetes (20%) y tratamiento corticoideo (10%). La duración media del cuadro clínico hasta el diagnóstico fue de 5,70+4,29 días. De los datos clínicos destacaron fiebre (80%), cuadro confusional (80%), focalidad neurológica (90%), crisis comicial (40%), signos meníngeos (30%) y afectación de pares craneales (20%). Se realizó punción lumbar a todos los pacientes, objetivándose pleocitosis linfocitaria con hiperproteínorragia en 8 casos (80%); en 2 no había celularidad. La serología IgM para virus herpes simple tipo I en sangre fue positiva en el 50%.

La PCR a HVS en LCR se realizó a 6 pacientes siendo positiva para HSV tipo I en uno y negativa en cinco. A todos los pacientes se les realizó TAC craneal siendo normal en el 70% de los casos y RNM craneal que mostró alteraciones radiológicas en 7 casos (4 casos no presentaban lesiones en TC previo y 3 casos confirmando hallazgos de TC). Se realizó EEG en la mitad de los pacientes y presentaban hallazgos patológicos en todos los casos. La totalidad de los pacientes fue tratada con aciclovir iv, con una duración media de 18,0 + 5,37 días. Ingresaron en UCI, 4 pacientes con una estancia media en ella de 8,25 + 6,70 días. La mortalidad fue del 20% (2 casos). Tuvieron secuelas neurológicas al alta el 40% (deterioro cognitivo moderado-severo 3 casos, afasia 1, paresia 1). La estancia media hospitalaria fue de 26,22 + 15,45 días.

Conclusiones: La EH se presenta como cuadro febril con confusión y focalidad neurológica. La TC craneal al ingreso muestra baja sensibilidad a diferencia de RNM craneal, debiendo ser la técnica de imagen de elección ante la sospecha de EH. El inicio precoz de tratamiento con aciclovir ha reducido la morbimortalidad, pero persiste elevada dependencia funcional al alta.

030

INCIDENCIA DE INFECCIÓN POR *POLIOMAVIRUS BK* EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE ÓRGANO SÓLIDO

P. Muñoz, M. Fogeda, B. Loeches, F. Anaya, R. Bañares, J. Palomo, E. Bouza y el grupo de estudio de BKV

Servicios de Microbiología-Enfermedades infecciosas, Nefrología, Digestivo y Cardiología. H.G.U. Gregorio Marañón. Madrid.

Antecedentes: El *poliomavirus BK* es causa de enfermedad infecciosa emergente que afecta preferentemente a trasplantados renales y de progenitores hematopoyéticos. Nuestro grupo ha observado recientemente, en un estudio de prevalencia (CID 2005; 41:1720), su presencia en otros receptores de trasplante de órgano sólido (cardíaco y hepático). Sin embargo, son necesarios estudios prospectivos de incidencia para definir mejor el papel patogénico del VBK en estos pacientes.

Objetivo: Determinar la incidencia de infección por VBK en los distintos tipos de receptores de trasplante de órgano sólido.

Material y métodos: Se estudió la presencia de infección por virus BK en todos los pacientes que recibieron trasplante de órgano sólido desde agosto del 2005 a enero 2006 en nuestro centro. Hasta el momento, se han obtenido muestras de sangre y orina las semanas 1, 4 y 12 postrasplante. Se recogieron además datos epidemiológicos, de inmunosupresión y de función renal. La presencia del DNA de VBK se detectó inicialmente mediante una nested-PCR cualitativa. Las muestras positivas se cuantificaron mediante PCR a Tiempo Real con sondas Taq Man.

Resultados: Se analizaron un total de 37 pacientes trasplantados: 17 renales (TR), 14 hepáticos (TH) y 5 cardíacos (TC). La edad media fue 45 ± 12 años y 22 fueron hombres. Por tipo de trasplante, se detectó viruria/viremia en la primera semana (37 pacientes): TR 53%/53%, TC 40%/ 20%, TH 20%/7%. En la semana 4 (27 pacientes), tuvieron viruria/viremia: TR 57/43%, TC 100%/ 100%, TH 50%/40%. En la semana 12 (15 pacientes) tuvieron viruria/viremia: TR 33%/33%, TC 66,6%/0%, TH 50%/50%. La frecuencia de disfunción renal fue: en la semana 1, 88,2% TR, 0% TC, 42,8% TH; en la semana 4: 85,7% TR, 33,3% TC, 0,4% TH; en la semana 12: 66,6% TR, 0% TC, 25% TH. La mediana de creatinina fue más elevada en los pacientes con viremia por VBK: TR 6,9 mg/dl vs 4,3 mg/dl, TC 1 mg/dl vs 0,8 mg/dl y TH 1 mg/dl vs 0,9 mg/dl.

Conclusiones: La incidencia de Viruria/Viremia en TOS en España es mucho más alta de lo esperado y ocurre de manera precoz en el periodo postrasplante (primer trimestre). Pese a la elevada incidencia de infección por BKV la disfunción renal parece sólo significativa en pacientes con trasplante de riñón.