

Sesión 25

Infecciones gastrointestinales.

Helicobacter

516

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE HECES EN PACIENTES GERIÁTRICOS INSTITUCIONALIZADOS

A. Amor Armendia, A. Morente, R. de Julián Pérez, M. Martínez y M. Baquero Mochales

Servicio de Microbiología del Hospital Carlos III. Madrid. Javier Caballero Bello. Fernando Martín Cincas.

Objetivo: Descripción de la prevalencia de patógenos gastrointestinales en residentes de un centro de la 3ª edad en la Comunidad de Madrid, en ausencia de brote epidémico.

Material y métodos Estudio de muestras fecales de 50 residentes tomadas al azar en un período de 15 días. Se realizaron las siguientes pruebas: -Coprocultivo. -Detección de toxina de *Clostridium difficile* mediante un inmunoensayo rápido. -Detección de virus enteropatógenos: Adenovirus, Rotavirus, por inmunocromatografía, y virus Norwalk y Astrovirus, mediante test inmunoenzimáticos ampliados. -Detección de *Helicobacter pylori* en heces, con un ensayo inmunoenzimático ampliado. -Estudio de parásitos en heces por técnica de concentración en formol-éter. La edad y estancia media de los residentes era de 85 años y de 24 meses respectivamente. De los 50 seleccionados 11 (22%) presentaban un cuadro diarreico. Todos tenían patología crónica y tratamiento habitual de la misma; Ninguno presentaba patología gástrica aguda.

Resultados: En 7 de las muestras (14%) se detectaron Adenovirus y Rotavirus de forma concomitante; en 1 muestra Adenovirus (2%) y en otra Rotavirus de forma aislada (2%). Sólo en 5 de estos 9 casos existía clínica de diarrea. Se detectaron 5 casos de Astrovirus (10%), uno relacionado con un cuadro diarreico y un caso de virus Norwalk (2%), también en un paciente con diarrea. En 22 de las muestras se obtuvo un resultado positivo para *H. pylori* (44%). No se aislaron bacterias ni parásitos enteropatógenos.

Conclusiones: Del total de pacientes con diarrea se detectó un virus enteropatógeno en el 63,6%; En el 36,4% de los casos de diarrea no se encontró una causa infecciosa. Aunque la prevalencia de virus enteropatógenos en la población estudiada es alta, sólo el 46,6% se acompañó de clínica. En el momento de realizar el estudio el 53,4% de los casos eran portadores asintomáticos y no desarrollaron ningún cuadro clínico compatible posteriormente. Se detectaron 22 casos de *H. pylori*; aunque no había datos clínicos de patología asociada es posible que ésta estuviera infradiagnosticada.

517

GASTROENTERITIS POR *YERSINIA ENTEROCOLITICA*. 1.994-2.003

R. Martínez Ruiz, B. Orden Martínez y R. Millán Pérez
Servicio de Microbiología. C.E. Argüelles (H.U. Puerta de Hierro), Madrid.

Objetivo: Conocer las características de la gastroenteritis por *Yersinia enterocolitica* en nuestra Área Sanitaria y su resistencia antibiótica.

Métodos: Durante diez años (1.994 – 2.003) se aislaron 301 cepas de *Y. enterocolitica* de diferentes pacientes. Para su aislamiento, las heces se sembraron en placas de cefsulodin-irgasan-novobiocina (BBL, Becton-Dickinson) y se incubaron a 37° durante 24 horas. La identificación bioquímica y sensi-

bilidad antibiótica se realizaron mediante los sistemas semiautomáticos Pasco (Difco) y Wider (Soria Melguizo).

Resultados: De los 301 pacientes, 169 (56,1%) eran varones y 132 (43,9%) mujeres, con unos límites de edad de 3 meses y 71 años y siendo el 87,3% pacientes pediátricos (= 14 años). El 58,4% de los pacientes presentaba heces diarreicas en el momento del diagnóstico y se observaron leucocitos en las heces de 76 pacientes (25,6%), de los cuales 72 eran niños. En 42 casos se aisló junto con otro enteropatógeno: en 19 pacientes con *Campylobacter jejuni*, en 9 con *Salmonella enterica*, en 4 con *Aeromonas* sp., en 4 con *Giardia lamblia*, en 2 con Rotavirus y en 1 con Adenovirus; y en 3 pacientes con dos o más: 1 con *C. jejuni* y *Salmonella enterica*, 1 con *C. jejuni* y *Aeromonas* sp., 1 con *Entamoeba histolytica* y *Ascaris lumbricoides*. No hubo diferencias estacionales y el mayor número de aislamientos se produjo en el mes de Septiembre. Todas las cepas aisladas fueron resistentes a ampicilina y cefazolina y sensibles a gentamicina y cefotaxima, 41 cepas (13,6%) fueron resistentes a cotrimoxazol, siendo mayor esta resistencia en niños (14,4%) que en adultos (7,9%); otras 41 cepas lo fueron a ácido nalidíxico (marcador de resistencia a fluorquinolonas); y 4 fueron resistentes a los dos.

Conclusiones: *Y. enterocolitica* se aisló predominantemente en niños, siendo más frecuente en varones. No encontramos predominio estacional. El patrón de sensibilidad antibiótica fue semejante en todas las cepas, variando en su resistencia al cotrimoxazol y al ácido nalidíxico.

518

ESTUDIO DE 85 AISLADOS CLÍNICOS DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* EN UN PERÍODO DE 10 AÑOS

M.E. Álvarez, L. Villa, A. Morilla, M. Lantero, I. de Diego y M. Rodríguez

S. de Microbiología I. Hospital Universitario Central de Asturias.

Objetivo: Conocer las características microbiológicas y epidemiológicas de cepas de *Y. enterocolitica* aisladas de heces en el laboratorio de Microbiología I de HUCA desde 1 de Enero de 1994 hasta 31 de Diciembre de 2003.

Material y métodos: Se realizó un estudio retrospectivo de los aislados de *Y. enterocolitica* en heces en un período de 10 años. Se cultivaron un total de 15093 muestras en los medios habituales para aislamiento de bacterias patógenas intestinales incluyendo una placa de Agar Selectivo de *Yersinia* (Biomedics) incubada 24 horas a 35-37°C. La identificación de las colonias sospechosas en este medio y pruebas de sensibilidad se hicieron usando el sistema comercial Wider (Difco). El estudio del serotipo se realizó mediante aglutinación utilizando sueros O:3 y O:9 (Bio-Rad) y el biotipo siguiendo el esquema de Wauters.

Resultados: De los 15093 coprocultivos realizados se aislaron 85 cepas de *Y. enterocolitica* (3,7%), 1295 de *Salmonella* sp (56,2%), 894 de *Campylobacter* sp (38,8%) y 30 de otros patógenos (1,3%). Todos los aislados excepto dos fueron del serotipo O:3, fueron resistentes a ampicilina y cefalotina y un 10% a trimetoprim-sulfametoxazol. El grupo de edad más afectado fueron los menores de 14 años (84,05%) y el resto (5,95%) mayores de 21 años; fue más frecuente en varones (60,86% frente a 39,14%). El cuadro clínico más común fue síndrome diarreico, que en la mayoría de los casos no precisó hospitalización; cuatro casos presentaban además, artritis de rodilla (1), eritema nudoso (1) (ambos en adultos) y adenitis mesentérica (2). No hubo diferencia estacional, ni se presentaron brotes, apareciendo siempre de forma esporádica. El número de aislamientos se mantuvo en los 7 primeros años del estudio y descendieron ligeramente en el último trienio.

Conclusiones: 1) Uniformidad de las cepas de *Y. enterocolitica* en cuanto a biotipo, serotipo y sensibilidad a antimicrobianos. 2) La infección es esporádica y afecta principalmente a la población infantil. 3) Aunque su frecuencia es escasa, es el tercer patógeno bacteriano en nuestro entorno, siendo por tanto imprescindible el uso del medio selectivo.

519

DETECCIÓN DE UN CLON MAYORITARIO DE *SALMONELLA* DERBY EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS HUMANOS DE ORIGEN PORCINO

S. Valdezate, A. Vidal, S. Herrera-León, J. Pozo, P. Rubio, M.A. Usera y A. Echeita

Objetivos: Análisis de la clonalidad y del perfil de susceptibilidad a antimicrobianos presentada por aislamientos de distinta procedencia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Derby (*S. derby*), uno de los serotipos predominantes asociado a ganado porcino.

Material y métodos: Se analizaron 110 cepas de *S. derby* obtenidas durante el período 2000-02: 47 cepas procedentes de la colección del LNRSS (16 cepas de origen humano, 23 alimentario, 6 de animales enfermos, 2 ambientales) y 63 cepas de 48 cerdos para consumo humano (procedentes de 6 unidades de cebo y 4 explotaciones de origen). Mediante la técnica de difusión en disco (NCCLS) se determinó la sensibilidad a 23 antimicrobianos. El estudio de la clonalidad se realizó mediante la caracterización molecular por electroforesis en campo pulsado (PFGE), tras restricción con 40U de *Xba*I y bajo las condiciones: pulsos 2s- 64s, 6V/cm, 22h. 14°C (Salm-Gene).

Resultados: Los porcentajes de resistencia a antimicrobianos (criterios NCCLS, M100-S12) mostrados por las cepas del grupo LNRSS y del grupo de los cerdos para consumo humano fue, respectivamente: espectinomicina (100 y 100%, Sh), tetraciclina (81 y 78%, Te); estreptomycin (47 y 72%, S); sulfamida (47 y 67%, Su); ampicilina (17 y 39%); cotrimoxazol (15 y 33%); ácido nalidixico (11 y 5%), gentamicina (2 y 39%), tobramicina (2 y 33%), amikacina (0 y 5%), netilmicina (0 y 5%) y cloranfenicol, (2 y 33%). No se detectaron resistencias a amoxicilina-clavulánico, cefalosporinas de primera y segunda generación, imipenem, y fluoroquinolonas. El estudio molecular mediante PFGE mostró una gran variabilidad genética en grupo LNRSS con un índice de Simpson del 0,99 y una tipabilidad del 96%. Se identificaron 24 pulsotipos, con un rango del coeficiente de similitud genética 32-96% (índice de Dice, UPGMA). Se observó en las muestras de procedencia humana (10 perfiles/16 cepas), alimentaria (9/23), de animales enfermos (4/6), ambiental (2/2) y en cerdos de consumo humano (6/48). Once de los clones fueron únicos (10% de las cepas), detectándose un clon mayoritario en el 52,7% de las cepas estudiadas: 3 cepas de origen humano, 12 cepas de alimentos de origen porcino, en 1 de animal enfermo y en 1 de ambiente y en 42 cepas obtenidas de 30 cerdos de matadero (5 unidades de cebo/ 4 explotaciones de origen). El fenotipo de resistencia predominante fue Sh-S-Te-Su.

Conclusión: La detección de un clon mayoritario en ganado porcino para consumo humano, su aparición en el alimentos con este mismo origen y su aislamiento posterior en humanos, indicaría que este tipo de alimentos serían vehículos responsables de la diseminación específica de este clon de *S. derby* a humanos.

520

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN Y LA TIPIFICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE *SALMONELLA* EN MUESTRAS CLÍNICAS HUMANAS

J. Alvarez*, M. Sota**, A.B. Vivanco*, I. Perales***, R. Cisterna**, A. Rementeria*, y J. Garaizar*

*Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Vitoria-Gasteiz. **Servicio de Microbiología Clínica, Hospital de Basuto, Bilbao.

***Laboratorio de Salud Pública, Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco, Bilbao.

Introducción: *Salmonella enterica* es uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial. En España

los serotipos de *Salmonella* más frecuentemente aislados en muestras clínicas son Enteritidis, Typhimurium, Hadar y subespecie I serotipo 4,5,12. La PCR múltiple ha demostrado ser una técnica con un gran potencial para la detección de patógenos en muestras clínicas.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue desarrollar una técnica de PCR múltiple que permitiera simultáneamente la detección y la tipificación epidemiológica de los serotipos y fagotipos más importantes en muestras clínicas.

Materiales y métodos: Se diseñaron 6 parejas de cebadores para que amplificaran fragmentos con la misma longitud que las bandas de marcadores de peso molecular de 100 pb. También se sintetizó un control de amplificación interno para detectar inhibición de la reacción de PCR. Dicho control consistía en una secuencia quimérica de ADN que era incluida en cada reacción y amplificada por dos de los cebadores de la mezcla. Se optimizó la reacción de PCR y se puso a punto un protocolo de purificación de ADN que incluía enriquecimiento previo en caldo Selenito-Cistina y la utilización de polietilenglicol como favorecedor de la PCR.

Resultados: La aplicación de esta técnica de PCR múltiple a muestras de ADN obtenidas a partir de cepas en cultivo puro originó diferentes perfiles de amplificación que nos permitieron diagnosticar la presencia de *Salmonella* y distinguir los serotipos Enteritidis, Typhimurium y subsp. I ser. 4,5,12. La técnica también permitió detectar los fagotipos DT104 y U302 dentro del serotipo Typhimurium. *Salmonella* Hadar y otros serotipos pertenecientes al grupo serológico C2 mostraron 2 perfiles de bandas específicas. En muestras clínicas la tasa de inhibición de la PCR fue baja (8%). La sensibilidad fue 0,93, la especificidad fue 1.0 y la eficiencia fue 0,98. El índice de correlación kappa obtenido al comparar la PCR múltiple con las técnicas de diagnóstico convencionales fue 0,95 lo que indicó alta concordancia entre ambas técnicas.

Conclusión: La PCR múltiple que describimos en este trabajo es una alternativa rápida, efectiva, simple y barata a los métodos de diagnóstico y tipificación convencionales.

521

FACTORES DE VIRULENCIA, CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AISLADOS EN CATALUÑA

A. Benavente*, G. Prats*, N. Larrosa*, J. Blanco**, A. Echeita*** y R. Bartolomé*

*Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebrón. Universitat Autònoma de Barcelona. **Laboratorio de Referencia de *E. coli*. Facultad de Veterinaria de Lugo. ***Laboratorio de Enterobacterias del ISCIII.

Objetivos: Caracterizar los principales genes de virulencia, las relaciones clonales, fagotipos y sensibilidad antibiótica de 30 cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas en Cataluña de pacientes con gastroenteritis en un período de 13 años (1990-2003).

Métodos: Se detectaron los genes de virulencia por PCR con cebadores específicos para los genes *stx*₁ y *stx*₂ (verotoxinas 1 y 2), gen *eae*- α 1 (intimina específica de *E. coli* O157:H7), y el gen *ehxA* (enterohemolisina). También se investigaron los genes comunes en los *E. coli* O157:H7: gen *eae* (intimina general), gen *pO157* (plásmido pCDV419), gen *rfbE*_{O157} (antígeno somático O157) y gen *fliC*_{H7} (antígeno flagelar). El subtipo epidemiológico se realizó mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) tras digerir el DNA total con *Xba*I. El fagotipado (16 cepas) se realizó en el Laboratorio de Enterobacterias del ISCIII. Se estudió la sensibilidad de las cepas a 23 antibióticos mediante el método de Kirby-Bauer.

Resultados: El 70% (21/30) de las cepas fue *stx*₁+/*stx*₂+ y el 26,6% (8/30) fue *stx*₁-/*stx*₂+. Sólo una cepa (3,3%) fue *stx*₁+/*stx*₂-. La intimina específica del serotipo O157:H7, el plásmido pCDV419, la enterohemolisina plasmídica y los antígenos somáticos y flagelares, se detectaron en el 100% de los casos. Se obtuvieron 29 patrones diferentes (1 no tipable) mediante PFGE y 6 fagotipos (3 no tipables): (2, 8, 14, 31, 54

y 87), no obstante, el 56,2% (9 cepas) se pudieron englobar en sólo 3 fagotipos: 2 (3 cepas), 8 (3 cepas) y 14 (3 cepas). El 60% (18/29) de las cepas fue sensible a todos los antibióticos. Además, 8 (26,6%) fueron resistentes a cotrimoxazol, 8 (26,6%) a doxiciclina, 4 (13,3%) a ampicilina, 3 (10%) al ácido nalidixico, 2 (6%) a cloramfenicol y 1 (3,3%) a kanamicina. El 26,6% (8 cepas) fueron multiresistentes.

Conclusiones: En nuestra área geográfica, como en otros países, la mayoría de las cepas de *E. coli* O157:H7 son portadoras de la verotoxina 2, y con menos frecuencia de la verotoxina 1. El fagotipado es una técnica menos discriminativa que PFGE, ya que cepas con el mismo fagotipo muestran diferentes patrones de PFGE. En general todas las cepas se mantienen bastante sensibles.

522

PREVALENCIA, SEROTIPOS, GENES DE VIRULENCIA, TIPOS DE INTIMINAS, PERFILES DE PFGE Y FAGOTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI* VEROTOXIGÉNICOS EN COPROCULTIVOS (2003)

M. Blanco¹, J.E. Blanco¹, J.M. Pita², D. da Silva Leite¹, A. Mora¹, G. Dahbi¹, P. Justel¹, M.P. Alonso², M.A. Coira², M.A. Echeita³ y J. Blanco¹

¹Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela,

²Unidade de Microbiología, Complexo Hospitalario Xeral-Calde, Lugo, ³Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Madrid

Introducción: Los *E. coli* verotoxigénicos (ECVT) son importantes patógenos emergentes que causan patologías severas en seres humanos: colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. Los rumiantes constituyen el principal reservorio, siendo la carne picada y las hamburguesas los vehículos de transmisión más comunes. Sus genes de virulencia más importantes son *vt1* y *vt2* que codifican para las verotoxinas y *eae* que codifica para la intimina responsable de las lesiones intestinales de adhesión y borrado.

Objetivos: El objetivo de este estudio era establecer la prevalencia y las características de los ECVT aislados de coprocultivos de pacientes de nuestro hospital durante el año 2003.

Materiales y métodos: La detección de los ECVT se realizó por PCR (genes *vt1*, *vt2*, *eae*) a partir del crecimiento obtenido en agar MacConkey Lactosa y agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixima.

Resultados: Se procesaron un total de 834 coprocultivos de muestras obtenidas entre el 5 de Mayo y el 31 de Diciembre del año 2003. Los ECVT se detectaron en 55 (6,6%) casos, pudiéndose realizar el aislamiento del ECVT O157:H7 en 7 (0,8%) casos y de los ECVT no-O157 en 21 (2,5%) casos. Entre el 10 de Septiembre y el 17 de Octubre se detectaron 6 de los 7 casos positivos para el ECVT O157:H7. Los serotipos enterohemorrágicos O157:H7 y O26:H11 fueron los más frecuentemente aislados, habiendo provocado dos pequeños brotes familiares. Todas las cepas implicadas en el mismo brote presentaron el mismo perfil de PFGE (electroforesis en campo pulsado) que resultó ser diferente a los perfiles encontrados en los casos esporádicos causados por los mismos serotipos. El 67% de los ECVT aislados presentaron el gen *eae*. Las cepas del serotipo O157:H7 presentaron la intimina tipo gamma-1 y las del serotipo O26:H11, H- la intimina tipo beta-1. Las cepas del serotipo O157:H7 pertenecieron a los fagotipos 8, 32, y 34. El brote fué causado por una cepa del fagotipo 8, que es el más frecuentemente aislado en nuestro hospital.

Conclusiones: Confirmamos los resultados obtenidos en un estudio previo realizado entre los años 1992 y 1999 (Blanco et al. J Clin Microbiol 2004, 42:311-319) en el que se comprobó que los ECVT de los serotipos O26:H11 y O157:H7 son una causa significativa de infecciones intestinales en nuestra área sanitaria.

523

PREVALENCIA, SEROTIPOS Y TIPOS DE INTIMINAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATÓGENOS ATÍPICOS EN COPROCULTIVOS (1996-1999)

M. Blanco*, J.E. Blanco*, G. Dahbi*, M.P. Alonso**, C. Madrid***, A. Juárez***, E.A. González*, M.I. Bernárdez* y J. Blanco*

*Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela,

Unidade de Microbiología, Complexo Hospitalario Xeral-Calde de Lugo, *Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Introducción: Los *E. coli* attaching and effacing (ECAE) poseen el gen *eae* que codifica para la intimina responsable de la lesión intestinal de adhesión y borrado. Existen tres categorías de *E. coli* diarreagénicos que poseen el gen *eae* y se incluyen dentro de los ECAE: *E. coli* verotoxigénicos, *E. coli* enteropatógenos típicos y *E. coli* enteropatógenos atípicos. Los ECEP atípicos no producen verotoxinas ni poseen el gen *bfp* presente en el plásmido EAF de los ECEP típicos.

Objetivos: El objetivo de este estudio era determinar la prevalencia de los ECEP atípicos en los coprocultivos de los pacientes de nuestro hospital y determinar los serotipos y el tipo de intimina de las cepas aisladas.

Materiales y métodos: Se realizó la detección de los genes *eae*, *vt1*, *vt2*, y *bfp* por PCR a partir del crecimiento obtenido en agar MacConkey lactosa y agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixima. Los coprocultivos que amplificaron únicamente con el gen *eae* se consideraron positivos para ECEP atípicos. Posteriormente se procedió al aislamiento de las cepas y al tipado de las intiminas empleando un sistema de PCR desarrollado por nuestro grupo capaz de identificar 19 tipos de intiminas (Blanco et al. J Clin Microbiol 2004, Vol 42 No. 2, en prensa).

Resultados: Entre los años 1996 y 1999 hemos procesado un total de 2015 coprocultivos de pacientes con diarrea u otras alteraciones gastrointestinales. Los ECEP atípicos los aislamos de 105 (5,2%) muestras, resultando ser el enteropatógeno bacteriano más frecuentemente recuperado después de *Salmonella* (7,4%). Las 105 cepas de ECEP atípicos se repartieron en un amplio abanico de serogrupos O (n = 42) y serotipos O:H (n = 64). Los serotipos más frecuentes fueron: O26:H- (6 cepas), O26:H11 (3), O51:H49 (5), O123:H19 (4), O128:H2 (3), O145:H- (8) y O145:H28 (4). Las cepas resultaron positivas para 15 intiminas diferentes: alfa-1 (3 cepas), alfa-2 (2), beta-1 (35), beta-2 (3), gamma-1 (12), gamma-2 (16), delta (5), epsilon (9), zeta (6), eta (5), iota (0), lambda (0), my-A (1), my-B (1), ny-A (0), ny-B(3), xy-A (2), xy-B (0), y omicron (2). Después de secuenciar el gen *eae* de dos cepas de los serotipos O84:H- (Secuencia AJ584841) y O129:H- (AJ584840) se descubrió una nueva variedad de intimina a la que se denominó omicron.

Conclusiones: Los ECEP atípicos con una amplia variedad de serotipos y tipos de intiminas son aislados frecuentemente de los coprocultivos de pacientes de nuestra área sanitaria.

524

INCIDENCIA DE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS Y/O ADENOVIRUS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA.

R. Alonso, A. Blázquez, A. Pérez Parra, J. Martínez Alarcón, M. Rodríguez Creixems y E. Bouza

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

Introducción: Los rotavirus y los adenovirus constituyen la principal causa de gastroenteritis en población infantil en países desarrollados y en vías de desarrollo y tiene una gran repercusión económica y sanitaria. Recientemente hemos in-

troducido en nuestro laboratorio una prueba inmunocromatográfica que permite la detección de ambos virus simultáneamente.

Objetivo: Conocer la incidencia de la infección por rotavirus y adenovirus y de la coinfección por ambos agentes etiológicos así como su distribución en los servicios del hospital y su estacionalidad.

Materiales y métodos: Se estudió un total de 1002 muestras de heces no formes procedentes de pacientes del hospital infantil. Las muestras fueron recogidas en contenedores estériles y enviadas al laboratorio de Microbiología para su análisis, durante un período de 12 meses (enero a diciembre de 2003). Se utilizó un sistema inmunocromatográfico (biorapid ROTA-ADENO, BIOKIT, S.A.) que contiene una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con látex coloreados. El sistema incluye un tampón de extracción antigénica y un dispositivo en fase sólida con los anticuerpos inmovilizados. La técnica se realiza en un tiempo máximo de 10 minutos y la interpretación se ve facilitada por la diferente coloración de cada resultado y por la inclusión de un control del test.

Resultados: Se detectaron un total de 221 muestras positivas para rotavirus (22%) y 232 para adenovirus (23,1%). Un total de 109 muestras (10,9%) fueron positivas para ambos virus. El 93% de las peticiones procedieron de 4 Servicios del Hospital Infantil: Pediatría, Urgencias, Neonatología y UVI. La tasa de positividad para rotavirus varió del 13,5% en Neonatología al 34,7% en la UVI; para adenovirus de 17,8% en Pediatría, al 28,6% en la UVI y la coinfección del 8,3% en Pediatría al 22,4% en la UVI. La máxima incidencia (positividad > 25%) se registró en los meses de diciembre a abril para rotavirus, noviembre a mayo para adenovirus y enero a marzo para la coinfección.

Conclusiones: La coinfección rotavirus/adenovirus supuso un hecho frecuente siendo una décima parte de las muestras enviadas para determinación de rotavirus y adenovirus positivas para ambos virus. Las mayores tasas de positividad fueron registradas en pacientes críticos. Los meses más fríos del año se correspondieron con mayores incidencias de infección en todos los casos.

525

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE INMUNOCROMATOGRAFIA PARA LA DETECCIÓN DE ANTIGENO DE ROTAVIRUS Y ADENOVIRUS EN HECES

Y. Gil, M.S. Cuetara, G. Seseña, S. Quevedo, R. Jiménez, A. Sanchez-Fauquier e I. Wilhelmi

Introducción: Rotavirus grupo A es la causa más frecuente de gastroenteritis aguda severa en niños pequeños en todo el mundo. La detección de antígeno de rotavirus y adenovirus en heces por métodos comerciales es una práctica habitual en los laboratorios de Microbiología clínica.

Objetivos: Evaluar dos métodos comerciales de inmunocromatografía (ICT), VIKIA Rota-Adeno (BioMérieux) y Adeno-Rota Combi-strip (Coris BioConcept) que detectan simultáneamente antígeno de rotavirus y adenovirus en heces con el fin de encontrar el ensayo de mayor sencillez, especificidad, y sensibilidad.

Métodos: Se estudiaron un total de 352 muestras de niños menores de 4 años con gastroenteritis aguda, 58 de ellas provenientes de colección, almacenadas a -20°C y 294 heces frescas recibidas en el laboratorio. Todas las muestras se estudiaron por las dos técnicas de ICT (VIKIA y Combi-Strip) y se utilizaron las técnicas de Enzimo-inmunoensayo (IDEIA Rotavirus e IDEIA Adenovirus, Dako diagnostics) como métodos de referencia.

Resultados: La técnica de ICT VIKIA mostró una sensibilidad y especificidad para Rotavirus de 100% y 97,5% respectivamente, mientras que la de Combi-strip presentó unos valores de 98,4% y 99,6% con respecto al método de Enzimo-inmunoensayo. Para las mismas técnicas se calculó la

sensibilidad y especificidad para el adenovirus y los resultados fueron de un 93,3% de sensibilidad y 100% de especificidad para VIKIA y de un 90% y 97,8% respectivamente para Combi-strip.

Conclusiones: En nuestro estudio, ambas técnicas inmunocromatográficas se mostraron útiles y rápidas y con valores de sensibilidad y especificidad comparables con respecto al método de referencia utilizado. La técnica VIKIA ofrece la ventaja de su mayor simplicidad además de requerir una mínima manipulación de la muestra.

526

DIAGNÓSTICO DE BROTES DE GASTROENTERITIS PRODUCIDOS POR NOROVIRUS MEDIANTE UNA TÉCNICA COMERCIAL DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS

A. Limia, J.C. Sanz, L. García-Comas, I. Rodero, A. Vivo y A. Sánchez-Fauquier

Objetivos: Evaluar una técnica de enzoinmunoanálisis (EIA) para el diagnóstico de brotes de gastroenteritis por norovirus.

Métodos: Todas las muestras de heces de brotes con sospecha de infección vírica recibidas durante 2003 en el Laboratorio Regional de Salud Pública de la Comunidad de Madrid se analizaron mediante EIA (IDEIA Norwalk like Virus, DakoCytomation), Microscopía Electrónica (ME) y RT-PCR. El criterio de confirmación de un brote de gastroenteritis por norovirus se basó en al menos dos resultados positivos por RT-PCR.

Resultados: De 14 brotes de gastroenteritis investigados (un total de 75 muestras y una media de 9,7 muestras por brote; rango 2 - 22), 5 de ellos (35,7%) cumplieron el criterio de confirmación por norovirus. Para el diagnóstico de brotes, la sensibilidad y la especificidad del EIA (al menos dos resultados positivos) fueron del 100% (5/5 y 9/9 respectivamente). La técnica de ME aportó en la confirmación de brotes una sensibilidad del 80% (4/5) y una especificidad del 100% (9/9). La sensibilidad y la especificidad del EIA respecto a muestras individuales (sin tener en cuenta su inclusión en brotes) fue del 61,3% (19/31 muestras positivas por RT-PCR) y su especificidad del 97,7% (43/44 muestras negativas por RT-PCR). Estas cifras para ME fueron del 41,9% (13/31) y del 95,4% (42/44).

Conclusiones: El EIA evaluado puede resultar una buena alternativa para el diagnóstico de brotes comunitarios causados por norovirus.

527

DETECCIÓN, GENOTIPADO Y DISTRIBUCIÓN TEMPORAL DE NOROVIRUS PRODUCTORES DE CASOS ESPORÁDICOS Y DE BROTES EPIDÉMICOS DE GASTROENTERITIS EN ASTURIAS

J.A. Boga, J. Ordás, S. Melón, M. Villar, D. González, M.A. Temprano y M. de Oña.

Servicio de Microbiología I, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Introducción: Los Norovirus forman un género dentro de la familia *Caliciviridae* que se ha dividido en dos genogrupos: GGI con siete genotipos y GGII con diez genotipos. Estos agentes han sido descritos como importante causa de gastroenteritis viral, tanto de casos esporádicos como de brotes epidémicos.

Objetivos: Estudiar la implicación de los norovirus, así como su distribución temporal, en las gastroenteritis agudas a lo largo de tres años.

Material: Se analizaron 1177 muestras que fueron recogidas durante tres años desde febrero de 2001 hasta enero de 2004. De ellas 1146 correspondían a casos esporádicos y 31 a dos brotes epidémicos ocurridos en un hospital (26 muestras)

y en un asilo (5 muestras). Tres sistemas comerciales basados en la técnica del ELISA se utilizaron para detectar la presencia de Rotavirus, Adenovirus y Astrovirus. Para la detección de los Norovirus se desarrolló un sistema de detección de un fragmento de la región codificadora de la ARN polimerasa viral basado en la RT-PCR. Su genotipado se determinó mediante secuenciación de los amplicones y posterior análisis filogenético de las cepas detectadas.

Resultados: Se identificaron virus en 323 (28,2%) de las muestras provenientes de casos esporádicos, detectando Rotavirus en 208 (64,4% de las muestras positivas), Norovirus en 50 (15,5%), Astrovirus en 41 (12,7%) y Adenovirus en 24 (7,4%). En cuanto a la distribución temporal, en el año 2001, el 56,2% de las muestras positivas para Norovirus ese año se concentran en el segundo cuatrimestre; en el año 2002, el 52,6% en el tercer cuatrimestre y en el año 2003, el 60% en el cuarto cuatrimestre. Es precisamente en este último período cuando tuvieron lugar los dos brotes epidémicos estudiados, detectando Norovirus en 6 (23,1%) de las muestras procedentes del hospital y en 5 (100%) de las del asilo. El genotipado de las cepas de Norovirus identificadas demostró que todas ellas pertenecían al genogruppo II, genotipo Bristol/Lorsdale.

Conclusiones: Este estudio pone de manifiesto que los Norovirus representan la segunda causa de casos esporádicos gastroenteritis virales detrás de los Rotavirus, corroborando su importancia como causantes de brotes esporádicos. Se observa un cambio estacional en la aparición de Norovirus en las distintas temporadas. Además se demuestra que en nuestra región existe un único genotipo circulante.

528

PREVALENCIA DE PARASITOSIS INTESTINALES EN NIÑOS DE GRUPOS SOCIALES DESFAVORECIDOS EN LA CIUDAD DE ALICANTE (ESTUDIO PILOTO)

D. Torrés Tendero, N. Maestre Maestre, L. Navarro Martínez y F.J. Bornay-Llinares

Consulta de Enfermedades Importadas y Parasitología Clínica. Servicio de Medicina Interna. H.G. Universitario de Alicante. División de Parasitología. Universidad Miguel Hernández.

Objetivo: Conocer la prevalencia de parasitosis intestinales en población pediátrica de grupos sociales desfavorecidos (niños de asentamientos periurbanos y niños inmigrantes).

Material y métodos: Estudio observacional de tipo transversal. Se examinaron 3 grupos de niños: grupo A: niños de etnia gitana residentes en asentamientos periurbanos; grupo B: niños inmigrantes escolarizados; grupo C (control): niños escolarizados nacidos en Alicante. Se recogieron 3 muestras fecales/ niño, en la escuela y/o vivienda. Se realizó encuesta clínico-epidemiológica y consentimiento informado a los padres. Análisis parasitológico: concentración por método de Ritchie modificado y observación del sedimento con lugol. Método de Graham para el estudio de oxiuros.

Resultados: Se estudiaron 57 niños (grupo A: 17; grupo B: 20; grupo C: 20). Edad media: 5,96 años (0,5 – 14); sexo: varones 59,6%, mujeres 40,4%. En 29 niños (50,9%) se encontró algún parásito: grupo A: 11 (64,7%), grupo B: 12 (60%), grupo C: 6 (30%). Multiparasitismo en el 48,3% de los niños parasitados: grupo A: 73%, grupo B: 33,3%, grupo C: 33,3%. Especies parasitarias más frecuentes: Blastocystis hominis 22 casos (9 grupo A, 8 grupo B, 5 grupo C), Entamoeba coli 9 (5 grupo A, 4 grupo B), Enterobius vermicularis 6 (4 grupo A, grupo B, 1 grupo C), Endolimax nana 5 (3 grupo A, 1 grupo B, 1 grupo C), Giardia intestinalis 3 (2 grupo A, 1 grupo C), Ascaris lumbricoides 3 (3 grupo B). Se observó algún helminto en el 45,4% de los niños parasitados del grupo A, en el 33,3% de los del grupo B y en el 16,6% de los del grupo control. El 100% de los niños del grupo A carecían de agua potable y desagüe en su vivienda.

Conclusiones: 1) La prevalencia de parasitosis intestinales es mayor en los niños de asentamientos periurbanos y en los inmigrantes que en el grupo control. 2) El multiparasitismo

y las helmintiasis (excepto la ascariidiosis) son más frecuentes en los niños de asentamientos periurbanos que en los inmigrantes por el alto grado de contaminación fecal del entorno. 3) La precariedad de la vivienda y de las condiciones higiénicas son más importantes que la procedencia geográfica como factores condicionantes de las enteroparasitosis. *Agradecimientos:* EVES (PS-029/2002)

529

RELACIÓN ENTRE ÚLCERA GASTRODUODENAL Y SÍNTOMAS GASTRODUODENALES CON LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA: ESTUDIO RETROSPECTIVO DE 3 AÑOS

A. Perkins*, M.J. Martínez**, T. Alarcón*, A. Pérez de Ayala* y M. López-Brea*

**Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Princesa.*

***Unidad de Gastroenterología Hospital Infantil Niño Jesús.*

La infección por *Helicobacter pylori* se adquiere en la mayoría de los casos durante la niñez y su diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante endoscopia digestiva alta. La mayoría de estudios señalan que la úlcera péptica es rara en niños, así como no encuentran asociación entre dolor abdominal y esta infección, aunque sugieren que *H. pylori* puede ser la causa de dolor abdominal recurrente.

Objetivos: Determinar la incidencia de infección por *H. pylori* y la de úlcera gastroduodenal, la relación entre ambas, así como la existente entre sintomatología gastroduodenal y la infección por este microorganismo, durante un período de tres años (1999 – 2001) en población pediátrica.

Métodos: Se estudiaron un total de 659 pacientes pediátricos, 308 niños y 351 niñas, con edades comprendidas entre 1 y 17 años (302 menores y 357 mayores de 10 años), con sintomatología gastroduodenal, a los que se realizó endoscopia digestiva alta. El motivo de consulta fue dolor epigástrico en 578 pacientes, dolor abdominal recurrente en 27 y sangrado en 54. La presencia de *H. pylori* se estableció mediante Urea breath test y cultivo siguiendo metodología convencional.

Resultados: La presencia global de *H. pylori* fue del 56,75% (374 de los 659 pacientes). Se encontraron 61 casos de úlcera gastroduodenal (9,3% de los niños con sintomatología), esta patología se encontró en 37 de los 374 niños infectados por *H. pylori* (9,9%) y en 24 de los 285 no infectados (8,5%). De manera inversa, la infección por *H. pylori* en pacientes con úlcera fue del 60,6% y del 56,3% en los pacientes sin esta patología. La frecuencia de pacientes con dolor epigástrico infectados y no infectados por *H. pylori* fue de 62,2% (360) y 54,2% (313) respectivamente, mientras que en los pacientes con dolor abdominal recurrente fue de 40,7% (11) y 59% (16) respectivamente. Sólo 3 de los pacientes con sangrado estaban infectados por *H. pylori*.

Conclusiones: (1) La úlcera gastroduodenal es rara en la población pediátrica, independientemente de la infección por *H. pylori*. (2) En nuestro estudio, la infección por *H. pylori* fue similar en pacientes con y sin úlcera gastroduodenal. (3) En nuestro estudio, encontramos asociación entre la infección por *H. pylori* y el dolor epigástrico.

530

EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TÉCNICA DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *HELICOBACTER PYLORI* EN HECES

J. Domínguez*, M. Forné**, S. Blanco*, C. Prat*, J.M. Viver** y V. Ausina*

**Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. **Servei de Gastroenterologia. Hospital Universitari Mútua de Terrassa. Barcelona*

Objetivos: 1) Evaluar la eficacia de un nuevo test (Amplified IDEIA™ Hp StAR™. DakoCytomation) para detectar

antígeno de *H. pylori* en heces, comparando los resultados con la endoscopia, el test del aliento con C13 (UBT), la prueba de la ureasa rápida (Clo-test). 2) Comparar los resultados con el ELISA Premier Platinum HpSA EIA test (Meridian Diagnostics). 3) Estudiar la utilidad del mismo para monitorizar la eficacia del tratamiento erradicador.

Métodos: Se han incluido 209 pacientes con infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* con dos de las tres pruebas realizadas positivas. El grupo control estaba constituido por 44 pacientes con dispepsia funcional en los que los anteriores tests para la detección de *H. pylori* fueron negativos. En todos los casos se tomó muestra de heces para determinación de antígeno de *H. pylori*. En 126 pacientes con infección por *H. pylori*, a las 6 semanas de finalizar el tratamiento erradicador, se repitió la detección de antígeno en heces y el UBT.

Resultados: Mediante el Amplified IDEIA™ Hp StAR™ se detectó antígeno de *H. pylori* en 192 muestras de los 209 pacientes del grupo de estudio y en 12 muestras de los 44 pacientes del grupo control. La sensibilidad del test fue del 91,8% y la especificidad del 72,7%. En 198 pacientes del grupo de estudio y en 41 del grupo control se realizó la detección de antígeno mediante Amplified IDEIA™ Hp StAR™ y Premier HpSA test obteniendo unos resultados de sensibilidad del 91,9% y del 89,4% y de especificidad del 70,7% y del 80,5%, respectivamente. En los 126 pacientes con muestra post-tratamiento el resultado del test del aliento fue negativo en 101 pacientes, de los cuales el Amplified IDEIA™ Hp StAR™ fue negativo en 94 casos (93,1%) y positivo en 7. Mediante el test de Meridian se obtuvo resultado negativo en 80 casos (79,2%) y positivo en 21. Por el contrario el test del aliento fue positivo en 25 pacientes, siendo el Amplified IDEIA™ Hp StAR™ también positivo en 20 casos (80%) y negativo en 5. El test de Meridian fue positivo en 17 casos (68%) y negativo en 8.

Conclusiones: 1) El Amplified IDEIA™ Hp StAR™ (DakoCytomation) es una técnica rápida, sencilla, que presenta una sensibilidad del 91,8% y una especificidad del 72,7% para la detección de antígeno de *H. pylori* en heces. 2) La técnica es de utilidad para indicar la erradicación de *H. pylori* tras el tratamiento, ya que correlaciona en un 90,5% con el test del aliento realizado a las seis semanas. 3) Los resultados de Amplified IDEIA™ Hp StAR™ comparados con los del reactivo HpSA de Meridian en el diagnóstico de la infección por *H. pylori* muestran que es una técnica con una sensibilidad similar pero con una especificidad ligeramente inferior. 4) El reactivo de DAKO muestra una mayor correlación con el test del aliento en la monitorización de la erradicación que el test HpSA de Meridian.

531

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DEL GEN BABA2 QUE CODIFICA LA ADHESINA BABA DE *HELICOBACTER PYLORI* EN PACIENTES CON GASTRITIS Y ÚLCERA PÉPTICA

M. Soler, P. Camba, C. Sanchez, R. Conde, J.L. del Pozo, C. Prieto, R. Angós, M. Muñoz, J. Leiva y M. Iriarte
Departamentos de Microbiología, Digestivo y Anatomía Patológica. Facultad de Medicina y Clínica Universitaria. Universidad de Navarra.

Objetivos: Analizar la importancia del gen babA2 que codifica la adhesina BabA de *Helicobacter pylori* en el desarrollo de trastornos gastroduodenales.

Material y métodos: Se analizaron por PCR los distintos marcadores de patogenicidad de *H. pylori* y se estableció una correlación con la patología observada en el paciente infectado con especial atención a la relevancia del genotipo babA2+.

Resultados: Se analizaron 53 biopsias de pacientes infectados por *H. pylori* y diagnosticados de úlcera péptica (15), o gastritis (38). En las cepas de *H. pylori* aisladas se determinó el genotipo del gen vacA (s1 o s2, m1 o m2) y cag (presen-

cia de cagA, cagE y cagT) mediante PCR. Se definieron tres grupos; Grupo A (30 cepas): vacA s1m1 o s1m2, cag +; Grupo B (4 cepas): vacA s1m1 o s1m2, cag -; Grupo C (19 cepas): vacA s2m2, cag -. En cada uno de estos grupos se determinó por PCR la presencia del alelo babA2. El alelo babA2 se detectó en un 63,3% de las cepas del grupo A; un 25% de las cepas del grupo B y en ningún caso en las cepas del grupo C. Entre los *H. pylori* procedentes de pacientes diagnosticados de úlcera (15 casos), 11 pertenecían al grupo A y sólo 6 de ellos presentaban el alelo babA2. Sin embargo, en ninguno de los 4 casos de úlcera asociada a una infección con cepas del grupo C se detectó la presencia de babA2. Entre los 38 *H. pylori* procedentes de pacientes diagnosticados de gastritis, 14 (36,8%) presentaban el alelo babA2. De esos 14, 13 fueron aislados de pacientes con gastritis activa, y sólo 1 de un paciente con gastritis inactiva. Además en 6 de estos 14 casos, incluyendo la cepa asociada a la gastritis inactiva, se observaron focos de metaplasia.

Conclusiones: La presencia del alelo babA2 parece estar asociada a la presencia de los alelos vacA s1m1 o s1m2 y del islote de patogenicidad cag. En nuestro estudio, el genotipo babA2 no es determinante de la presencia de úlceras o gastritis o el desarrollo de focos de metaplasia en las infecciones por cepas que ya tienen los marcadores del grupo A, aunque sí podría estar asociada al grado de actividad de la respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica.

532

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE LEWIS EN CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* DE PACIENTES PEDIÁTRICOS Y ADULTOS MEDIANTE ELISA Y SU CORRELACIÓN CON LA GASTRITIS Y LA ÚLCERA.

J.A. García-Campos, T. Alarcón, D. Domingo, D. Monclús y M. López-Brea

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid.

Introducción: *Helicobacter pylori* (Hp) debe de tener mecanismos que le aseguren la persistencia en el estómago humano durante largos períodos de tiempo. Un probable mecanismo es la evasión de la respuesta inmune del hospedador mediante la mimetización antigénica. *Helicobacter pylori* puede sintetizar antígenos de Lewis en su lipopolisacárido (LPS) que son comúnmente expresados en células y fluidos del hospedador.

Objetivos: Conocer y comparar la expresión de antígenos de Lewis (Le^x y Le^y) en cepas de muestras clínicas de pacientes pediátricos y adultos. En las cepas de adultos se estudió la relación de dichos antígenos con la enfermedad gástrica del paciente (gastritis o úlcera).

Materiales y métodos: Se estudiaron 106 cepas de muestras clínicas (50 de niños y 56 de adultos). De los 56 adultos, 15 padecían gastritis y 41 úlcera. La expresión de los antígenos de Lewis (Le^x y Le^y) se estudió mediante la técnica de ELISA utilizando células completas de Hp como antígeno. El cultivo de Hp tras 48 horas de incubación se lavaba con NaCl 0,15M. En cada pocillo de fondo plano de una microplaca se ponían 100 µL de cada cepa con una concentración proteica de Hp de 60 µg/ml en tampón de recubrimiento. Se dejaba pegar el antígeno una noche a 4°C. Tras lavar con PBS-T se añadía el correspondiente anticuerpo monoclonal (Le^x y Le^y). Una hora después se volvía a lavar y se añadía el anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina. Era revelado con pNPP y se leía la absorbancia a 405nm.

Resultados: El 46% (23/50) de las cepas de niños expresaban Le^x y el 58% (29/50) Le^y (p>0,05). El 28% (16/56) de las cepas de adultos expresaban Le^x y el 60% (34/56) Le^y (p<0,01). No existió diferencia estadísticamente significativa en la expresión de antígenos de Lewis entre adultos y niños. Las cepas de los pacientes adultos con úlcera expresaron alguno de los dos antígenos de Lewis en el 78% (32/41) de los

casos y las cepas de pacientes con gastritis en el 33,3% (5/15) ($p = 0,01$). El antígeno Le^x lo presentaban el 46,3% (15/41) de las cepas de los pacientes con úlcera y el 6,6% (1/15) de las cepas de los pacientes con gastritis ($p > 0,05$). El antígeno Le^y lo presentaron el 70,7% (29/41) de las cepas de los pacientes con úlcera y el 33,3% (5/15) de las de pacientes con gastritis ($p = 0,01$).

Conclusiones: En este estudio se observa que: 1- no hay diferencias en la expresión de antígenos de Lewis en cepas de adultos o niños, 2- los pacientes con úlcera expresan más frecuentemente antígenos de Lewis que los pacientes con gastritis y 3- el antígeno de Lewis más expresado por los pacientes con úlcera es Le^y.

533

ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE EL GENOTIPO DE *HELICOBACTER PYLORI*, LAS ALTERACIONES HISTOLÓGICAS Y EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO

M. Soler, P. Camba, R. Conde, C. Sánchez, C. Prieto, R. Angós, M. Muñoz, J.J. Sola, L. Panzano, J. Leiva y M. Iriarte

Departamentos de Microbiología, Digestivo y Anatomía Patológica. Facultad de Medicina y Clínica Universitaria. Universidad de Navarra.

Objetivos: Estudiar la relación entre la presencia de las distintas variantes genéticas de *H. pylori* y el desarrollo de gastritis y úlceras pépticas.

Material y métodos: Se analizaron 72 biopsias de pacientes infectados por *H. pylori* y diagnosticados de úlcera péptica, o gastritis. En cada biopsia se evaluó la densidad bacteriana, el grado de inflamación, de actividad, y de metaplasia intestinal, atendiendo a la escala visual analógica de la clasificación de Sidney-Houston. En las cepas de *H. pylori* aisladas se determinó el genotipo del gen vacA (s1 o s2, m1 o m2) y cag (presencia de cagA, cagE y cagT) mediante PCR. Se definieron tres grupos; Grupo A: vacA s1m1 o s1m2, cag +; Grupo B: vacA s1m1 o s1m2, cag -; Grupo C: vacA s2m2, cag-.

Resultados: Un 54,2% de las cepas pertenecían al grupo A y correspondieron a los siguientes diagnósticos histológicos: 22,3% úlcera péptica (un 11,2% con focos de metaplasia); 23,6% pangastritis activa (un 47,5% con focos de metaplasia) y 8,4% de pangastritis inactivas (un 20% con focos de metaplasia). Un 11,1% de las cepas pertenecían al grupo B y se asociaron con: 2,8% úlcera péptica (un 50% con focos de metaplasia); 4,2% pangastritis activa y 4,2% de pangastritis inactivas. Entre las 34,7% de cepas que pertenecían al grupo C los diagnósticos observados fueron: 2,8% úlcera péptica; 15,3% de pangastritis activas (un 27,2% con metaplasia) y 13,9% de pangastritis inactivas. El grado de inflamación fue ligeramente superior en las biopsias correspondientes a pacientes infectados con cepas del grupo A. En estas mismas biopsias es donde se observó una densidad bacteriana más elevada.

Conclusiones: Los datos histológicos y endoscópicos parecen sugerir la existencia de una relación entre el genotipo de la cepa de *H. pylori* que está causando la infección y la patología observada en el paciente.

534

USO DE LAS BIOPSIAS TOMADAS PARA TEST DE LA UREASA EN LA MONITORIZACIÓN DE LAS RESISTENCIAS DE *HELICOBACTER PYLORI* A ANTIBIÓTICOS. RESULTADOS PRELIMINARES

M. Quesada, I. Sanfeliu, E. Brullet, R. Campo, F. Junquera, F. Segura y X. Calvet

Introducción: La resistencia a los antibióticos disminuye la eficacia del tratamiento de erradicación de *Helicobacter pylori*. Por este motivo es imprescindible disponer de cepas pa-

ra monitorizar la prevalencia de resistencias a antibióticos y su evolución en el tiempo. La utilización para el cultivo, de las biopsias positivas por la prueba rápida de la ureasa tiene varias ventajas, ya que reduce el número de biopsias y en consecuencia, la duración de la endoscopia, las molestias al paciente y los costos, permitiendo además, cultivar únicamente las biopsias probablemente positivas para *Helicobacter pylori*.

Objetivos: 1) Evaluar la recuperación de cepas *Helicobacter pylori* a partir de biopsias ureasa positivas. 2) Determinar la CMI50 y la CMI90 de los antibióticos evaluados en las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de estas muestras. 3) Determinar la prevalencia de resistencias a estos antibióticos.

Material y métodos: Se cultivaron las biopsias antrales ureasa positivas de aquellos pacientes en los que se realizó el test rápido de la ureasa (JATROX HP test; CHR Heim Arzneimittel GmbH, Alemania) para diagnóstico de *Helicobacter pylori* en el período de Enero a Diciembre de 2003. Se estudió mediante E-test (Etest®, AB BIODISK; Solna, Suiza) la sensibilidad a amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol, levofloxacino y moxifloxacino.

Resultados: De 55 biopsias positivas, se recuperaron un total de 47 cepas (85,5%). La CMI50 y la CMI90 fueron de 0,016 y 0,047 µg/ml para la amoxicilina, de 0,064 y 0,38 µg/ml para la tetraciclina, de 0,016 y 32 µg/ml para la claritromicina, de 0,016 y 0,75 µg/ml para el metronidazol, de 0,094 y 0,25 µg/ml para el levofloxacino y de 0,064 y 0,125 µg/ml para el moxifloxacino, respectivamente. Se observó un porcentaje de resistencia a amoxicilina del 5%, a tetraciclina del 10%, a claritromicina del 15% y a metronidazol de 10%. El 67,5% de las cepas fueron sensibles a estos cuatro antibióticos. Levofloxacino y moxifloxacino presentan una buena actividad frente a las cepas estudiadas.

Conclusiones: El cultivo de biopsias ureasa positivas es un método adecuado en la recuperación de cepas de *H. pylori*. Puede utilizarse para monitorizar la sensibilidad del germen a los antibióticos.

535

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD EN CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS

M. Soler, A. Aguinaga, S. Hernández, M. Lamata, J.L. del Pozo, M. Alonso, C. Prieto, R. Angós, M. Muñoz, M. Iriarte y J. Leiva

Departamentos de Microbiología, Digestivo y Anatomía Patológica. Facultad de Medicina y Clínica Universitaria. Universidad de Navarra.

Introducción y objetivos: El reciente descubrimiento de *Helicobacter pylori* y su papel en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales, ha iniciado una nueva era en el tratamiento de estas patologías. En los últimos años se han publicado datos que muestran un aumento en los niveles de resistencia a los antibióticos de uso común para el tratamiento de la infección por *H. pylori*. El objetivo de este estudio ha sido conocer la sensibilidad de cepas de *H. pylori* aisladas en nuestro laboratorio a los antibióticos utilizados con más frecuencia en la terapia empírica de las infecciones por este microorganismo.

Material y métodos: Desde Octubre del 2000 a Diciembre del 2003 se procesaron 292 biopsias procedentes de pacientes con diversas patologías digestivas. Las muestras se sembraron sobre el medio de cultivo comercializado por la firma Biomerieux (Pylori medium, Biomerieux.) y un medio suplementados con sangre. Las placas se incubaron a 37°C en microaerofilia durante 3-7 días. La determinación de la susceptibilidad antibiótica in vitro, se realizó determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Metronidazol, Claritromicina, Amoxicilina y Doxiciclina por el método E-test. Para ello realizamos un inóculo bacteriano con un Mc Farland de 4 en medio Columbia suplementado con 5% de

sangre de carnero, durante 72 h en condiciones de microaerofilia. La sensibilidad se definió siguiendo las recomendaciones del "Nacional Comité for Clinical Laboratory Standards 2000":

Resultados: Se han obtenido 145 cultivos positivos para *H. pylori*. Los porcentajes de resistencia a los antimicrobianos probados fueron: claritromicina 22.8%, metronidazol 33.1%, doxiciclina 0% y amoxicilina 0%. Así mismo se comprobó un aumento de resistencia a metronidazol y claritromicina a lo largo del estudio.

Conclusiones: Los porcentajes de resistencia encontrados son superiores a los descritos en otros estudios. Esto puede ser debido a la recurrencia de la infección. Ante el aumento de resistencias observadas, consideramos imprescindible realizar cultivo y determinación del perfil de sensibilidad (CMI) para la elección de una terapia empírica adecuada.

536

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE FURAZOLIDONA Y NITROFURANTOINA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *HELICOBACTER PYLORI* Y ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN

M. Lopez-Brea, T. Alarcón, E. Aznar, J. Díaz-Regañón, J.A. García-Campos y P. De La Oña

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid

Objetivo: Determinar la actividad *in vitro* de furazolidona y nitrofurantoina en aislamientos clínicos de *H. pylori* resistentes y sensibles a claritromicina y/o metronidazol y determinar la frecuencia de mutación espontánea.

Materiales y métodos: Se obtuvieron un total de 164 aislamientos de *H. pylori* obtenidos durante 1999-2001 a partir de biopsias gástricas siguiendo la metodología habitual. La actividad *in vitro* se determinó mediante dilución en agar con Mueller Hinton suplementado con 7% sangre caballo y diluciones de los antibióticos (128-0,008mg/l). Se utilizó un inóculo elevado y las placas se incubaron a 37°C durante 2-5 días en un incubador de CO₂. Se consideró resistencia si CMI \geq 8mg/l para metronidazol, CMI \geq 1mg/l para claritromicina y CMI \geq 4mg/L para furazolidona y nitrofurantoina. Para el estudio de la frecuencia de mutación se seleccionaron 8 cepas sensibles. Las cepas se cultivaron en Brain Heart Infusion con extracto de levadura y 5% suero fetal bovino y se prepararon 15 a 20 alícuotas para obtener cultivos paralelos e independientes. El cultivo completo se cultivó en medio con 2mg/l de nitrofurantoina o furazolidona y en medio sin antimicrobianos. Se realizó recuento de colonias después de 4 días de incubación. La frecuencia de mutantes resistentes se determinó como el número de células resistentes dividido entre el número total de células viables por cultivo.

Resultados: 23,8% de las cepas eran resistentes a metronidazol, 16,8% resistentes y 1,4% intermedias a claritromicina. La CMI₅₀, CMI₉₀ e intervalo fue 0,125, 0,5 y 0,008 a 4mg/l para furazolidona y 0,5, 1, y 0,008 a 4mg/l para nitrofurantoina. 3 cepas fueron resistentes a furazolidona (1,82%) (CMI = 4mg/L) siendo sensible a nitrofurantoina (CMI = 2mg/L) y 1 cepa era resistente a nitrofurantoina (0,6%) (CMI = 4mg/l) siendo sensible a furazolidona (CMI = 1mg/L). Estas 4 cepas eran resistentes a metronidazol. No se detectó mutación espontánea a furazolidona ni a nitrofurantoina. Sin embargo si se observaron mutantes resistentes a metronidazol.

Conclusiones: Furazolidona y nitrofurantoina mostraron una excelente actividad *in vitro* frente a los aislamientos clínicos de *H. pylori* probados con un porcentaje de resistencia de 1,8% o 0,6% a pesar de relativamente alto porcentaje de resistencia a metronidazol y/o claritromicina. No se detectaron mutantes espontáneos a furazolidona ni a nitrofurantoina

537

RESISTENCIA A CLARITROMICINA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *HELICOBACTER PYLORI* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL: RELACIÓN ENTRE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN Y LA SENSIBILIDAD

T. Alarcón, J. García-Campos, A. Perkins, D. Domingo, A. Vega y M. López-Brea

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

La resistencia a claritromicina en *H. pylori* se produce, principalmente, por una mutación puntual en la posición 2142 o 2143 del gen ARNr 23S (cambio de Adenina por Guanina o Citosina).

Objetivo: estudiar la resistencia a claritromicina mediante PCR en tiempo real determinando: (1) la variabilidad en la temperatura de fusión (T_m) de dos controles de cepas de *H. pylori* repetidas 23 veces y (2) la T_m en aislamientos clínicos sensibles y resistentes a claritromicina.

Materiales y métodos: Se utilizaron dos cepas como control, una sensible a claritromicina (NCTC11638) y un aislamiento clínico resistente (HUP1298). Se estudiaron un total de 129 cepas obtenidas por cultivo a partir de muestras de biopsias gástricas. La sensibilidad a claritromicina de los aislamientos se determinó mediante dilución en agar considerando resistencia si CMI \geq 1mg/L. La extracción del ADN de los aislamientos se realizó mediante un protocolo descrito previamente (Ge & Taylor). Se amplificó un fragmento de 425pb del gen 23S ARNr en un LightCycler (Roche Diagnostics) y se utilizaron dos sondas: sonda anchor marcada con fluoresceína y sonda sensor marcada con LC-640 (secuencia de la cepa sensible). Después de la amplificación se determinó la T_m. En las dos cepas control se realizó el experimento 23 veces y se determinó la media y la desviación estándar de la T_m.

Resultados: La T_m en la cepa control sensible fue de 62.14 \pm 1.12 y en la cepa resistente fue de 55,7 \pm 1.2. La T_m fue 62,3 \pm 1,14 en las 63 cepas sensibles a claritromicina y de 56,4 \pm 2,4 en las 66 cepas resistentes. En 2 cepas sensibles y en 9 cepas resistentes se detectó heteroresistencia ya que se observaron T_m de 62 y de 56 simultáneamente.

Conclusiones: Se observó una buena correlación entre dilución en agar y la detección de mutación mediante PCR en Tiempo Real. La realización de la PCR en Tiempo Real a partir de biopsia gástrica permite detectar la resistencia a claritromicina sin necesidad de cultivo, aunque se necesitan mas estudios que permita determinar el grado de correlación clínica.

538

SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* AISLADAS EN LA ISLA DE LANZAROTE

F.J. Noguera, R. Copado y A. Valls

Lab. de Microbiología. Servicio de Análisis Clínico. H. General de Lanzarote.

Objetivo: Evaluar la sensibilidad a Metronidazol (MT), Amoxicilina (AM), Claritromicina (CL) y Tetraciclina (TE) de las cepas de *H. pylori* aisladas en lanzarote.

Métodos: Durante enero de 2001 hasta octubre de 2003 se recibieron 770 muestras de biopsias gástricas para investigación de *H. pylori*. De 391 cepas aisladas de *H. pylori*, se estudió la sensibilidad de MT y AM de 306 cepas, de CL de 265 cepas y de TE de 109 cepas. La sensibilidad se determinó mediante E-test (AB Biodisk) en Mueller-Hinton agar con 5% de sangre de carnero sembrada con una suspensión del microorganismo McFarland 3 en suero fisiológico, que se incubó a 37 °C en atmósfera microaerofílica con lectura a los 3,

4 ó 7 días. La resistencia fue definida como sigue: CMI ≥ 1 para AM y CL; CMI ≥ 2 para TE y CMI ≥ 8 para MT. *H. pylori* ATCC 43504 fue utilizada como control.

Resultados: No se detectó ninguna cepa resistente a AM y TE. 91 cepas (29,7%) fueron resistentes a MT y 35 cepas (13,2%) fueron resistentes a CL. La resistencia dual a MT y CL se detectó en 17 cepas (6,4%). La evolución de la resistencia antibiótica a MT y CL por años fue la siguiente:

	2001	2002	2003
MT	12/85 (14,1%)	35/131 (26,7%)	44/90 (48,9%)
CL	6/44 (13,6%)	11/131 (8,4%)	18/90 (20%)

Conclusiones: La resistencia encontrada a MT y CL es similar a las descritas en otras zonas de España, observándose un progresivo aumento de las mismas en el tiempo.

Tetraciclina se presenta como una potencial alternativa en el tratamiento de *H. pylori*, sobre todo en los casos de fracaso terapéutico.

539

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y EPIDEMIOLOGÍA DE *AEROMONAS* SPP. AISLADAS EN EL COPROCULTIVO DURANTE EL PERÍODO 1999-2003

A. González Prieto, M.P. Romero Gómez y C. Ladrón de Guevara
H.U. La Paz. Madrid.

Objetivo: Estudiar las características microbiológicas y epidemiología de 105 casos de *Aeromonas* spp aisladas en el cultivo de heces durante el período comprendido entre 1999-2003.

Material y métodos: Se revisaron retrospectivamente 105 casos de cuadros diarreicos con *Aeromonas* spp. aisladas en el coprocultivo. Las *Aeromonas* spp. se recuperaron en los siguientes medios: agar-sangre con ampicilina (ASA) incubado a 37 °C durante 18 horas y a partir de Marzo del 2002 se incluyó CIN que se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas. Todas las colonias oxidasa positivas y hemolíticas en ASA y aquellas con morfología compatible en CIN y oxidasa positivas tras pase a agar-sangre, fueron inoculadas en BEA, TSI e indol, completándose la identificación bioquímica mediante el sistema comercial Vitek®. La sensibilidad se determinó mediante sistema automatizado de microdilución en caldo (Wider®).

Resultados: Los aislamientos de *Aeromonas* spp. suponen un 0,91% del total de coprocultivos positivos durante estos 5 años. Las especies aisladas fueron *A. caviae* 58 (54,9%), *A. hydrophila* 22 (21,0%), *A. veronii* var. *sobria* 22(21,0%), *A. veronii* var. *veronii* 2(1,9%) y *A. schubertii* 1 (1.0%). En 70 (66,7%) de los casos fueron aisladas como enteropatógeno único y el resto acompañadas por *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica* y rotavirus. La distribución por grupos de edad y principales servicios peticionarios resultó: De 0-14 años (78 casos): urgencias (36), hepatología (9), neonatología (6), hematooncología (2). De 15-65 años (12 casos). Mayores de 65 años (14 casos): urgencias (4), medicina interna (6), oncología (2). A partir del año 2002, el número de aislados se vio incrementado de 9 casos en 1999, 5 en el 2000 y 13 en el 2001, a 33 en el 2002 y 40 en el 2003. *A. caviae* fue la especie más sensible a ampicilina (22,4%) seguida de *A. hydrophila* (9,1%) y el resto fueron resistentes. En general, todas fueron sensibles a quinolonas y el 80% sensible a cotrimoxazol.

Conclusiones: 1) El mayor número de casos se produce en niños, inmunodeprimidos (no VIH) y ancianos, siendo éstos últimos los que presentan una peor evolución clínica, requiriendo incluso, tratamiento antibiótico. 2) Tras introducir el medio CIN en la rutina de trabajo, hemos experimentado un aumento en el número de aislados de *A. caviae*, debidos a su sensibilidad a ampicilina que hacía difícil recuperarla en ASA.