

Sesión 29

Evaluación de nuevos métodos, sistemas diagnósticos y de sensibilidad antibiótica

607

EVALUACIÓN DE DISTINTAS TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A METICILINA EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

D. Velasco*, F. Molina, R. Moure, C. Zúñiga, R. Villanueva y G. Bou

C.H.U. Juan Canalejo. A Coruña.

Introducción: El incremento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) a nivel hospitalario y comunitario constituye un grave problema clínico y epidemiológico. La exactitud en la determinación de la resistencia a meticilina (met) en los aislamientos clínicos de *S. aureus* es fundamental para el tratamiento correcto y el control de cepas resistentes en el hospital. La resistencia a met en *S. aureus* se produce por la modificación de PBP2. La producción de esta proteína modificada (PBP2') genera resistencia a met y también al resto de antibióticos betalactámicos.

Objetivo: Evaluación de la sensibilidad (S) y especificidad (E) de distintas técnicas susceptibles de ser utilizadas en el laboratorio en la detección de SARM, utilizando la detección mediante PCR del gen *mecA* como referencia.

Material y métodos: Se consideraron 102 aislamientos clínicos de *S. aureus*, 51 portadores de *mecA* y 51 no portadores. Todos fueron aisladas de pacientes distintos y con localizaciones anatómicas diversas. Se determinó la resistencia a met en todas las cepas mediante métodos de: i) Difusión en disco con oxacilina 1 µg, y con otros betalactámicos que pudieran predecir la resistencia a met: cefazolina, cefoxitina, cefotaxima e imipenem todos 30 µg (BD BBL Sensi-Disc), ii) E-test de oxacilina, (AB Biodisk, Sweden) iii) Cribado en medio sólido con 6 µg/ml de oxacilina (Oxacilin Screen Agar, BD) y con 2 µg/ml (Oxacilin Resistance Screening Agar Base, Oxoid), iv) Microdilución en caldo (oxacilina de Sigma-Aldrich, Germany) v) Aglutinación (detección de PBP2', Slidex MRSA detección, Biomerieux). Las técnicas de difusión, microdilución y cribado con 2 µg/ml de oxacilina se evaluaron a las 24 y a las 48 h. utilizando los criterios de la NCCLS. Se calcularon los valores de S y E tomando la detección de *mecA* como referencia.

Resultados: Entre los antibióticos evaluados mediante difusión la cefoxitina es el que mejor predice la resistencia a

met (S del 100% a las 24 h.). La S para el disco de oxacilina es del 94% a las 24 h. y del 98% a las 48 h. El resto de antibióticos testados obtienen menores valores de S. La E es muy alta en todos los discos considerados. La S del E-Test alcanza únicamente el 94% a las 24 h. y el 98% a las 48 h. La E es del 100%. La placa de cribado con 2 µg/ml de oxacilina obtiene una S óptima (100%) aunque a costa de una baja E (92%). La placa con 6 µg/ml es más específica pero menos sensible (96%). La S de la microdilución es del 94% a las 24 h. La predicción de resistencia a met a través de la proteína PBP2' resulta muy sensible (100%) aunque presenta algunos problemas de E (96%).

Conclusiones: Existen cepas portadoras del gen *mecA* que escapan a los sistemas clásicos de detección de resistencia a met. La S del disco de cefoxitina para revelar dicha resistencia supera al resto de antibióticos. Los sistemas de microdilución y de E-Test generan similar número de falsos negativos que los sistemas de disco-difusión. La detección de PBP2' es un sistema fiable, rápido y asequible de predicción de resistencia a met. La combinación de dos técnicas, una sensible y otra específica, puede ser una alternativa cuando no es factible la detección de gen *mecA* por técnicas moleculares.

608

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN "IN SITU" (PNA FISH) PARA LA IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* A PARTIR DE HEMOCULTIVO

C. Vilaplana, M. Giménez, E. Padilla, V. González, G. Fernández y V. Ausina

Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. Barcelona.

Objetivos: Evaluar una técnica de hibridación "in situ" fluorescente mediante sondas de ácido nucleico (PNA) para la identificación directa de *S. aureus* (SA) a partir del hemocultivo. Compararla con la prueba de plasmocoagulasa en tubo (PC). Determinar el impacto clínico del diagnóstico microbiológico precoz de la bacteriemia por SA.

Métodos: se incluyeron 285 hemocultivos positivos (FA, FN, PF de BacT/Alert, bioMérieux), 104 pacientes, con observación de cocos grampositivos tipo estafilococo en la tinción de Gram. Se extrajeron 10 µL de la muestra a la que se añadió la sonda específica para la región 16S del rRNA, incubándose a 55 °C, 90'. Se realizó un lavado a 55 °C, 30', y observación en microscopio de fluorescencia. La prueba de la PC (bioMérieux) se aplicó a 45 hemocultivos después de centrifugar 5 mL de la muestra, 10' a 2000 rpm. Se interpretó como positiva la presencia de coágulo a las 4h de incubación.

Resultados: Todos los aislamientos de SA (105 sensibles a oxacilina y 23 MRSA) fueron identificados de forma correcta, directamente del hemocultivo, mediante PNA FISH. De los 157 hemocultivos en los que aisló Estafilococos coagulasa negativa (ECN), la hibridación fue negativa en 156 y positiva débil en 1 caso, correspondiente a *S. schleiferi*. La sensibilidad (S) de la técnica de PNA fue de 100% y la especificidad (E) del 99,4%. La prueba de PC fue positiva en 17 de 23 hemocultivos positivos para SA y en 1 con ECN (*S. hominis*), con una S = 82,6% y una E = 94,7%. En 73 casos se consideró la bacteriemia clínicamente significativa, siendo el foco más frecuente el catéter (79%), partes blandas (5%), úlcera cutánea (4%), vascular (3%) y respiratorio (3%). En un 63% de los casos la información microbiológica precoz (aprox. 2'30h.) influyó en la actitud terapéutica. En 13 pacientes se instauró tratamiento, en 18 se cambió al tratamiento de elección, en 8 a un tratamiento efectivo y en 7 únicamente se retiró el catéter.

Conclusiones: *S. aureus* PNA FISH es una técnica rápida, sensible y específica para la identificación directa de *Staphylococcus* spp. de hemocultivo. La prueba de la PC tiene una S y E inferior a la de la PNA. La información microbiológica rápida se traduce en un tratamiento precoz de la bacteriemia por SA contribuyendo a evitar el riesgo de complicaciones.

609

EFFECTIVIDAD Y TOLERANCIA DE LOS DISTINTOS ANTIBIÓTICOS ACTIVOS FRENTE A COCOS GRAM POSITIVOS MULTIRRESISTENTES EN PACIENTES CRÍTICOS INGRESADOS EN UCI

O. Rodríguez Colomo, C. León Gil, M.A. Blasco Navalpotro, J.C. Pozo Laderas, A. Torres Martí, F. García Córdoba y Grupo AGP (GTEI-SEMICYUC)

El uso de antibióticos (AB) activos frente a cocos grampositivos multirresistentes (CGP-MR), ha aumentado en los últimos años en los Servicios o Unidades de Cuidados Intensivos (UCI).

Objetivos: Conocer la respuesta clínica y microbiológica así como la tolerancia de los distintos antibióticos activos frente a CGP-MR en pacientes ingresados en UCI.

Material y método: Estudio observacional, prospectivo, abierto y multicéntrico. Se han incluido como caso la prescripción de cualquiera de estos AB: vancomicina (VAN), teicoplanina (TPN), quinupristina/dalfopristina (Q/D) y linezolid (LZD). Se han recogido datos demográficos, gravedad valorada por el sistema APACHE II, características de la infección (formas de presentación) y la respuesta clínica, tolerancia y mortalidad. Se ha hecho un análisis descriptivo presentando las variables cualitativas en forma de porcentaje y las cuantitativas como medias y desviación estándar. Las comparaciones entre AB se han realizado utilizando el chi cuadrado para variables cualitativas y la razón F para variables cuantitativas. El nivel de significación adoptado es 0,05.

Resultados: En este análisis preliminar, se han incluido 429 indicaciones de AB activos frente a CGP-MR: VAN, 224 (52,2%); TPN, 150 (35,0%); LZD, 55 (12,8%) Q/D, 0 (0), en 426 pacientes, procedentes de 19 UCI [edad media de 55,68 (DE 18,2) años, APACHE medio de 17,75 (DE 7,19), MD de la estancia en UCI 19 días]. La mortalidad global intra-UCI ha sido de 30,5%. Para valorar los resultados se han excluido los ttos. de menos de 3 días, y los ttos. de rescate se han valorado aparte. Se ha valorado como curación o mejoría (CoM) 218/282 (77,3%) casos y como fracaso clínico (FC) 42/282 (14,9%). La valoración de los ttos. de rescate (61 en 405 ttos., 15%), ha sido CoM 33/54 (61,1%) y FC 14/54 (25,9%). En cuanto a la eficacia microbiológica, se ha valorado como erradicación o presunta erradic. en 167/282 (59,2%) casos, teniendo en cuenta que han sido indeterminados 96/282 (34%). En las NRVM, se ha valorado como CoM en 61/81 (75,3%) y como FC en 18/81 (22,2%). En las NNRVM la eficacia clínica ha sido peor, se ha valorado como CoM en 21/41 (51,2%) y como FC en 15/41 (36,6%). La eficacia ha sido elevada en el tto. de las BPeIC, se ha valorado como CoM en 86/100 (86%) y como FC en 6/100 (6%). Se han comunicado efectos adversos en 13/426 casos (3%), de los cuales 7 han sido por toxicidad renal (5 con vancomicina y 2 con teicoplanina). Solo dos han tenido una evolución desfavorable.

Conclusiones: La eficacia clínica y microbiológica ha sido elevada, los efectos adversos han sido escasos y la mayoría de ellos con buena evolución, sin diferencias significativas entre los tres AB utilizados.

610

ACTIVIDAD INTRACELULAR DE GARENOXACINO (BMS284756; GAR) EN UN MODELO DE INFECCIÓN INTRAFAGOCÍTICA POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS O LISTERIA MONOCYTOGENES EN COMPARACIÓN CON OTRAS QUINOLONAS (LEVOFLOXACINO (LEV), CIPROFLOXACINO (CIP) Y MOXIFLOXACINO (MOX))

C. Seral, P.M. Tulkens y F. Van Bambeke

Objetivos: La capacidad de *S. aureus* y *L. monocytogenes* de sobrevivir, respectivamente, en los lisosomas y citosol de las células fagocíticas nos ha permitido estudiar la acumulación

y la actividad intracelular de distintas quinolonas en un modelo de macrófagos J774. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la acumulación y actividad intracelular de garenoxacino y otras quinolonas en un modelo de macrófagos infectados con *S. aureus* o *L. monocytogenes*.

Métodos: Macrófagos J774 fueron fagocitados por *L. monocytogenes* o *S. aureus* ATCC 25923 opsonizados con suero durante una hora y expuestos a GAR, LEV, CIP o MOX a diferentes concentraciones entre la CMI y la Cmax humana. La actividad intracelular fue medida como la reducción de log UFC durante 5 h (*L. monocytogenes*) o 24 h (*S. aureus*) y comparada con la actividad en medio líquido. Se calculó la acumulación intracelular en paralelo.

Resultados: En medio líquido, GAR y LEV se comportaron marcadamente bactericidas y concentración dependientes frente a *S. aureus* (actividad a , $-4.09 \pm 0,00$ y $-3.79 \pm 0,00$, respectivamente a Cmax), mientras que su actividad fue menor frente a *L. monocytogenes* (actividad a , $-1.70 \pm 0,00$ y $-1.54 \pm 0,02$, respectivamente a Cmax). Intracelularmente, ambos se comportaron concentración dependientes y con buena actividad frente a *S. aureus* (actividad a , $-1.64 \pm 0,16$ y $-1.36 \pm 0,05$, respectivamente a Cmax) mientras que frente a *L. monocytogenes*, GAR mostró mejor actividad (actividad a , $-1.22 \pm 0,06$ y $-0,42 \pm 0,09$, respectivamente a Cmax). La acumulación de GAR fue mayor que la de LEV en los macrófagos J774 (Cc/Ce 6 vs 3). MOX tuvo una actividad intracelular similar a GAR mientras que CIP se comportó de manera similar a LEV.

a log (CFU at 5h or 24 h - CFU at 0 h).

Conclusiones: GAR y LEV se han comportado como dos antibióticos concentración- dependientes intracelularmente, aunque los datos demuestran una actividad menor comparada con la actividad extracelular en medio líquido. La localización mayoritaria citosólica de las quinolonas y la mayor acumulación intracelular de GAR que de LEV explicarían la diferencia de actividad de ambos frente a *L. monocytogenes*. Respecto a *S. aureus*, la buena actividad intracelular de ambos demuestra la acumulación de una parte de las quinolonas en los lisosomas de los macrófagos y la influencia en éstos de otros factores como podría ser el pH de los mismos.

611

ESTUDIO PILOTO OBSERVACIONAL PROSPECTIVO ABIERTO PARA LA EVALUACIÓN DE ANTIBIÓTICOS GLUCOPEPTIDOS EN LÍQUIDO DE DRENAJE EN PACIENTES SOMETIDOS A CIRUGÍA OSTEOARTICULAR

J.R. Azanza, B. Sádaba, I. Gil-Aldea, E. García-Quetglas y M.A. Campanero

Objetivos: Evaluar las concentraciones de teicoplanina que se alcanzan en el lecho quirúrgico en pacientes sometidos a cirugía y su relación con las concentraciones plasmáticas.

Material y métodos: Se administraron dos dosis diarias i.v. de 400 mg de teicoplanina a catorce pacientes (edad comprendida entre 19 y 79 años, peso medio 79,2 \pm 8,4 kg, creatinina 0,9 \pm 0,3 mg/dl) con un proceso infeccioso de la zona quirúrgica. Se cuantificó la concentración de teicoplanina en los líquidos recogidos en los drenajes diariamente hasta su retirada. Una vez alcanzado el estado de equilibrio, se determinaron las concentraciones séricas de teicoplanina en los tiempos basal, 1, 4, 6 y 10 horas postadministración del fármaco. Las concentraciones se determinaron mediante inmunofluorescencia polarizada.

Resultados: Los parámetros farmacocinéticos medios de teicoplanina y la concentración que se alcanzó en el líquido drenado fueron los siguientes:

Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas de 0 a 12 h (AUC_{0-12h}) = 465,67 \pm 189,3 mg * h/l.

Semivida de eliminación ($t_{1/2}$) = 18,57 \pm 16,3 h.

Concentración plasmática máxima (Cmax) = 66,04 ± 22,7 mg/l.

Concentración plasmática mínima (Cmin) = 27,42 ± 15 mg/l.
Concentración media en el líquido de drenaje = 16,15 ± 6,9 mg/l.

Cantidad media en el líquido de drenaje en 12 h = 0,663 ± 0,6 mg.

Desde el punto de vista clínico, todos los pacientes evolucionaron favorablemente.

Conclusiones: La concentración media en el exudado fue superior a la concentración crítica de teicoplanina (8 µg/ml) en todos los casos excepto en uno (5, 28 µg/ml), por lo que prácticamente siempre se alcanzaron valores terapéuticos en el lecho quirúrgico. La cantidad de fármaco eliminado en el exudado presentó una alta variabilidad, con un coeficiente de variación del 43%, aunque en todos los casos supuso una pequeña proporción de la dosis administrada (0,16%). En el análisis de regresión, se observó una correlación significativa entre la concentración media alcanzada en el exudado y el AUC_{0-12h} (p = 0,004) o la Cmin (p = 0,003), no así en el caso de la Cmax (p = 0,082).

612

EVALUACIÓN DEL SISTEMA AUTOMATIZADO BD PHOENIX PARA LA IDENTIFICACIÓN Y EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A CARBAPENEMS DE CEPAS CLÍNICAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y *ACINETOBACTER BAUMANNII*

M.C. Conejo*, A. Pascual**, L. Martínez- Martínez*, ** y E.J. Perea*, **

*Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla,

**Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla.

Objetivo: Evaluar la fiabilidad del sistema automatizado BD Phoenix (Becton Dickinson) para la identificación y el estudio de la sensibilidad a imipenem (IPM) y meropenem (MPM) de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (Pae) y *Acinetobacter baumannii* (Ab).

Métodos: Se estudiaron 50 cepas de Ab y 50 de Pae no relacionadas clonalmente (determinado por PFGE y REP-PCR respectivamente) y con distinto grado de sensibilidad o resistencia a carbapenems. Entre las cepas de Ab se incluyeron cepas productoras de beta-lactamasas y con alteraciones en las PBPs y entre las de Pae, se incluyeron cepas con beta-lactamasa cromosómica inducible o desreprimida, carbapenemasas y con alteraciones en la expresión de la porina OprD. En la identificación y estudio de la sensibilidad a carbapenems mediante el sistema Phoenix se utilizaron los paneles Gram negative Combo NMIC/ID-12. La identificación de referencia de las cepas de Ab se realizó mediante pruebas bioquímicas (esquema de Bouvet y Grimont) y genotípicas (ARDRA). En el caso de Pae se utilizó el sistema API20NE (BioMérieux). Como método de referencia para estudiar la sensibilidad a carbapenems se utilizó la microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones del NCCLS.

Resultados: El sistema Phoenix identificó correctamente a nivel de especie todas las cepas de Pae, mientras que en el caso de Ab, de las 50 cepas evaluadas 46 fueron identificadas correctamente en el grupo *A. baumannii/calcoaceticus* complex (27 como *A. baumannii* y 19 como *A. baumannii/calcoaceticus* complex); las 4 cepas restantes fueron identificadas sólo a nivel de género. Los porcentajes de acuerdo esencial para Pae y Ab fueron 96% y 94% (IPM) y 96% y 100% (MPM). En ningún caso se obtuvieron errores máximos (falsa sensibilidad). Sólo se detectaron errores mayores (falsa resistencia) para IPM y Ab (2/50 cepas). Los porcentajes de errores menores para Pae y Ab fueron 6% y 18% (IPM) y 6% y 14% (MPM).

Conclusión: El sistema Phoenix es un método fiable para la identificación y estudio de la sensibilidad a carbapenems de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

613

MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) FRENTE A BACTERIAS ADHERIDAS

J.C. Alcalá, I. García, L. Martínez-Martínez, E.J. Perea y A. Pascual

Objetivos: Las biocapas bacterianas son muy resistentes a la actividad de los antimicrobianos. La complejidad y diferencias metodológicas de los diferentes estudios dificulta la reproducibilidad y comparación de los resultados. El objetivo de este trabajo es utilizar una modificación de la técnica clásica de microdilución para evaluar la CMB de bacterias adheridas.

Material y métodos: Se utilizaron *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984; productora de "slime", ica +). Se determinó la CMI y la CMB por el método de microdilución en caldo, según normas del NCCLS. Los antimicrobianos utilizados fueron: oxacilina (OXA), clindamicina (CLI), gentamicina (GNT), vancomicina (VAN), teicoplanina (TEI), ciprofloxacino (CIP), rifampicina (RIF), linezolid (LNZ) y daptomicina (DAP). La CMB de las bacterias adheridas (CMB_{ADH}) se determinó a partir de las mismas placas de microdilución utilizadas para evaluar la CMI y la CMB. Para ello, tras la extracción de 50 µl de cada pocillo para determinar la CMB, se lavaron todos los pocillos 2 x 150 µl PBS frío para eliminar las bacterias planctónicas y se rellenaron con 100 µl de PBS. Las placas se sellaron con un adhesivo y se sonicaron en un baño de sonicación (1 min; 40KHz) para desprender las bacterias adheridas. El número de bacterias supervivientes se determinó mediante recuento en agar. Cada experimento se realizó cinco veces en días diferentes.

Resultados: Con el método evaluado y las cepas estudiadas, los resultados obtenidos con los distintos antimicrobianos fueron reproducibles. En el caso de *S. aureus*, la CMB para las bacterias adheridas (CMB_{ADH}) de todos los antimicrobianos ensayados fue igual a la CMB de las bacterias planctónicas. En el caso de *S. epidermidis* ica+, la CMB_{ADH} de OXA y DAP fue igual a la CMB; los valores de CMB_{ADH} de VAN y TEI fueron, respectivamente, 64 y 32 veces superiores a la CMB; las CMB_{ADH} de LNZ y RIF fueron 128 veces superiores a la CMB; CIP y GNT presentaron, respectivamente, valores de CMB_{ADH} 512 y 64 veces superiores a los de CMB.

Conclusiones: 1) Con *S. Aureus* ATCC 29213, la CMB frente a las bacterias adheridas fue igual a la CMB de las bacterias planctónicas, y con *S. epidermidis* ica+ al menos 32 veces superior. 2) Los valores de CMB obtenidos mediante dilución en caldo solo indican su actividad bactericida frente a bacterias planctónicas.

614

INOCULACIÓN DIRECTA DE PANELES DE VITEK 2 A PARTIR DE FRASCOS DE HEMOCULTIVOS (BacT/ALERT 3D)

E. Ceballos, M. de Cueto, L. Martínez-Martínez, Y. Guerrero, E.J. Perea y A. Pascual

Objetivo: Estudiar la posibilidad de inocular las tarjetas de identificación y antibiograma del sistema VITEK 2 con inóculos obtenidos directamente de frascos de hemocultivos positivos del sistema BacT/ALERT FA (Biomérieux).

Método: Se estudiaron 100 hemocultivos positivos: 50 Bacilos Gram Negativos (BGN) y 50 Cocos Gram Positivos (CGP). Se compararon los resultados obtenidos mediante inoculación convencional e inoculación directa a partir de frascos positivos de hemocultivos BacT/ALERT FA (Biomérieux). Para inoculación directa se tomaron 2 tubos Vacutainer SST plus, uno con 6 ml de sangre del hemocultivo positivo y otro con 3 ml de sangre más 3 ml de un quelante del carbón (CSR) Ø. Se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm (1500xg). 3 ml del sobrenadante fueron transferidos en un nuevo Vacutainer con 3 ml de salina y se centrifugó 15 mi-

nutos a 3000 rpm. Del botón resultante se preparó una suspensión equivalente al 0,5 de McFarland con la que se inocularon las tarjetas. La inoculación convencional se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Resultados: 62% (31/50) de los BGN procesados sin el quelante CSR fueron correctamente identificados mientras que en el 44% (22/50) de los procesados con quelante se obtuvo una identificación correcta. Con ninguno de los dos métodos directos se consiguió la identificación correcta de ninguno de los CGP estudiados. En el estudio de sensibilidad el porcentaje global de errores para BGN fue del 5% sin el empleo del quelante y del 5,6% con su uso; 1,6% fueron errores máximos para ambos y 3,4% y 4% fueron errores menores respectivamente. No hubo errores mayores. Para los CGP la tasa global de errores fue del 12,2% y del 12,8% sin y con el empleo del quelante CSR con una elevada tasa de errores máximos y mayores.

Conclusiones: Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la inoculación directa de tarjetas de identificación y antibiograma de VITEK 2 a partir de frascos de hemocultivos positivos no es eficaz para acortar el tiempo de obtención de resultados definitivos de identificación y sensibilidad.

615

MODELO *IN VITRO* DE INFECCIÓN RELACIONADA CON RESERVORIO SUBCUTÁNEO. EVALUACIÓN DE VARIAS SOLUCIONES ANTIBIÓTICAS CON POTENCIAL USO CLÍNICO EN EL SELLADO ANTIBIÓTICO

J.L. del Pozo*, A. Aguinaga**, S. Hernáez**, A. Martínez***, M. Soler**, A. Serrera**, M. Fernández-Alonso** y J. Leiva**

*Área de Enfermedades Infecciosas. **Servicio de Microbiología Clínica. ***Servicio de Radiología. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona.

Objetivos: Los dispositivos intravasculares con reservorio subcutáneo (CVCR) se utilizan para facilitar un acceso venoso seguro y rápido en muchos pacientes. El tratamiento de estas infecciones es a menudo difícil debido a la existencia de biofilms bacterianos en el interior del reservorio. En estos biofilms, las bacterias son más resistentes a la acción de los antibióticos. En este trabajo presentamos un modelo *in vitro* de reservorio colonizado por *S. epidermidis* o *S. aureus* con el objeto de evaluar 56 soluciones antibióticas (con potencial uso clínico como soluciones de sellado antibiótico) para reducir o eliminar la colonización del reservorio.

Métodos: Se utilizaron 3 cepas de *S. aureus* y 3 cepas de *S. epidermidis*, todas ellas productoras de *slime*. Se desarrollaron biofilms de 24 y 168 h. de longevidad en el interior de los reservorios tras precondicionar el interior de los mismos con plasma humano, y se estudiaron 56 soluciones de sellado. Después de distintos periodos de SA de los dispositivos (1-10 días), éstos se cultivaron para comprobar si el SA había sido eficaz.

Resultados: Tanto en el caso de los dispositivos colonizados por *S. aureus* como por *S. epidermidis* observamos que a mayor concentración de antibiótico, es necesario menos tiempo para esterilizar el dispositivo. En general cuando las mezclas llevan heparina se muestran más eficaces, esto no es así en el caso de vancomicina y levofloxacino; en estos casos observamos que las mezclas con heparina se muestran menos activas que las soluciones con antibiótico únicamente. También observamos que cuando se realiza un recambio diario de la solución de sellado se consigue la esterilización del dispositivo en menos tiempo. Los antibióticos que mostraron una mayor eficacia para esterilizar el dispositivo fueron rifampicina, teicoplanina, linezolid, quinupristina-dalfopristina y cefazolina. Destacar que la clindamicina, el cloranfenicol o de forma más llamativa la claritromicina mostraron poca o ninguna eficacia para esterilizar los dispositivos.

Conclusiones: Los resultados de este estudio demuestran que el contacto prolongado del interior de un CVCR con una solución de antibiótico a concentraciones elevadas es eficaz a la hora de eliminar la colonización estafilocócica de su interior. Es importante considerar la adición de heparina en ciertos casos.

616

ESTUDIO PROSPECTIVO PARA EVALUAR EL TIEMPO DIFERENCIAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LA BACTERIEMIA RELACIONADA CON CATÉTERES VENOSOS CENTRALES TUNELIZADOS

J.L. del Pozo*, S. Hernáez**, A. Rodríguez**, M. Soler**, R. Díaz**, M. Rubio** y J. Leiva**

*Área de Enfermedades Infecciosas. **Servicio de Microbiología Clínica. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona.

Objetivos: Los catéteres venosos centrales con reservorio subcutáneo (CVCR) son necesarios en aquellos pacientes que precisan de la administración de nutrición o fármacos parenterales durante periodos prolongados de tiempo. El diagnóstico de la bacteriemia relacionada con estos dispositivos es difícil en muchas ocasiones debido a la inespecificidad de sus síntomas. *Blot* y *cols* describieron en 1988 un método diagnóstico que comparaba el tiempo diferencial (TD) hasta la positivización entre los hemocultivos extraídos simultáneamente a través del catéter y venopunción. Sin embargo, este método no ha sido validado hasta la fecha en CVCR. El objetivo de este estudio es determinar el valor del TD en el diagnóstico de la bacteriemia relacionada con CVCR utilizando como método diagnóstico de referencia los hemocultivos cuantitativos (HCC) (ratio a favor del catéter de 4:1).

Métodos: Durante un periodo de 3 años se evaluaron de forma prospectiva todas las bacteriemias ocurridas en pacientes portadores de CVCR. Se extrajeron simultáneamente a través del CVCR y venopunción dos HCC y dos hemocultivos convencionales. El punto de corte utilizado para el diagnóstico de bacteriemia relacionada con el dispositivo fue de 120 minutos a favor del CVCR.

Resultados: Se evaluaron un total de 129 episodios ocurridos en 119 pacientes. Se excluyeron del estudio 10 pacientes debido a que presentaban una infección del bolsillo subcutáneo. En el momento de la extracción de los hemocultivos 40 pacientes estaban recibiendo algún tipo de antibioterapia sistémica. De los 109 episodios, 83 (76,2%) fueron etiquetados como bacteriemia relacionada con el CVCR y 26 (23,8%) se etiquetaron como bacteriemias no relacionadas con el dispositivo en base a los resultados de los HCC. El TD medio de los episodios de bacteriemia relacionada con el CVCR (462,12 minutos, rango: -50 a 2010) fue significativamente mayor ($p < 0,001$) que el TD medio de los episodios de bacteriemia no relacionada con el CVCR (-33,07 minutos, rango: -510 a 450). La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del TD en comparación con los HCC fueron de 85,5%, 80,8%, 93,4% y 63,6% respectivamente.

Conclusiones: El TD es un método que permite el diagnóstico de la bacteriemia relacionada con CVCR sin retirar el dispositivo, de una manera sencilla y con una eficacia diagnóstica del 84,4%.

617

ESTUDIO PROSPECTIVO PARA DETECTAR LA COLONIZACIÓN DE CATÉTERES VENOSOS CENTRALES TUNELIZADOS EN PACIENTES HEMODIALIZADOS, MEDIANTE LA TINCIÓN CON NARANJA DE ACRIDINA Y EL CULTIVO DE CAPA LEUCOCITARIA DE LA SANGRE INTRACATETER

A. Aguinaga*, J.L. del Pozo**, S. Hernáez*, M. Alonso*, N. García-Fernández***, M. Fernández-Alonso*, M. Rubio* y J. Leiva*

*S. Microbiología Clínica. **Área de Enfermedades Infecciosas. ***S. Nefrología. Clínica U. Universidad de Navarra. Pamplona.

Objetivos: El uso de catéteres venosos centrales (CVC) resulta imprescindible en pacientes en programas de Hemodiálisis (PHD) debido a que estos pacientes requieren un acceso venoso frecuente y prolongado. La bacteriemia relacio-

nada con catéter (BRC) es la complicación más seria asociada a su uso. La colonización de la superficie interna del CVC es el primer paso en la patogénesis de la infección relacionada con catéter (IRC). El objetivo de este estudio es detectar de forma precoz la colonización del CVC mediante el empleo de la tinción con naranja de acridina (TNA) y el cultivo de la capa leucocitaria (CL) de la sangre intracatéter.

Material y métodos: Durante un periodo de 6 meses, realizamos un estudio prospectivo sobre una población de pacientes en PHD y portadores de CVC tunelizados. Cada 2 semanas se extraían 4 ml de la sangre intracatéter de cada paciente (de los que se obtenía la CL mediante centrifugación diferencial con la solución Polymorphprep®). La CL se teñía con naranja de acridina y se inoculaba sobre 3 placas de agar sangre. Si la TNA y/o los cultivos de CL eran positivos, se extraían hemocultivos cuantitativos simultáneamente a través de cada una de las luces del CVC y venopunción para descartar BRC. En los casos en los que se detectó una colonización significativa, se realizó tratamiento local del CVC mediante sellado antibiótico (SA).

Resultados: Se procesaron un total de 120 muestras de sangre procedentes de 14 pacientes. La tasa de CVC colonizados fue de 0,14 por cada 100 días de uso. En 8 pacientes se detectó una colonización significativa. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo del cultivo de la CL con respecto a los hemocultivos cuantitativos (*gold standard*) fue del 100%, 100%, 100% y 100%, respectivamente. Y los de la TNA del 89%, 100%, 100% y 99% respectivamente. El tratamiento local del CVC mediante SA consiguió eliminar la colonización en todos los casos.

Conclusión: La monitorización mediante el análisis de la sangre intracatéter es útil en la identificación de aquellos pacientes en PHD con un alto riesgo de desarrollar BRC. Los CVC colonizados pueden ser esterilizados eficazmente mediante SA. Las técnicas propuestas en el estudio (TNA y cultivo de CL de sangre intracatéter) son técnicas sencillas y rápidas que permiten detectar con gran sensibilidad y especificidad la colonización del CVC.

618

DETECCIÓN DE NEISSERIA MENINGITIDIS EN EL LCR DE PACIENTES CON MENINGITIS MENINGOCÓCICA CORRECTAMENTE TRATADA

D. Vicente, O. Esnal, A. Valiente, P. Idígoras y E. Pérez-Trallero
Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián.

Introducción: *Neisseria meningitidis* es la principal causa de meningitis bacteriana en niños y adultos jóvenes. El método diagnóstico de referencia es el cultivo bacteriológico. Las técnicas moleculares de PCR (convencional y a tiempo real) detectan el genoma de la bacteria. Estas técnicas aportan mayor sensibilidad y rapidez diagnóstica.

Objetivo: Investigar durante cuánto tiempo es detectable, mediante PCR a tiempo real, el DNA de *N.meningitidis* en el LCR de pacientes con meningitis meningocócica.

Método: Se seleccionaron LCR obtenidos de 3 grupos de pacientes entre los años 1986-93. Grupo Estudio: 40 LCR de 20 pacientes con meningitis meningocócica con una primera punción lumbar diagnóstica (LCR1) y una segunda punción lumbar de control tras el tratamiento (LCR2). En los 20 pacientes el cultivo del LCR1 fue positivo a meningococo (1 serogrupo A, 13 B y 6 C) y el cultivo del LCR2 negativo. El LCR2 se obtuvo una media de 11,5 días tras la primera punción (rango 8-24). Los 20 pacientes recibieron tratamiento antibiótico empírico y evolucionaron favorablemente. Grupo control A: 31 LCR de otros tantos pacientes oncológicos sin meningitis. Grupo control B: 35 LCR de otros tantos pacientes con meningitis bacteriana no meningocócica (20 *S. pneumoniae*, 7 *H. influenzae*, 2 *S. aureus*, 2 estafilococo coagulasa negativo, 1 *C. neoformans*, 1 *S. pyogenes*, 1 *M. organii*, 1 *P. aeruginosa*). Tras extracción del DNA con columna de

Qiagen se realizó PCR a tiempo real en LigthCycler. Se utilizaron iniciadores de una región altamente conservada del operón capsular (*ctrA*) para detección genérica de meningococo. En los LCR en los que se detectó *ctrA*, se realizó PCR con iniciadores serogrupo-específicos (serogrupos A, B, C, W135 e Y).

Resultados: Grupo Estudio: Se detectó meningococo (*ctrA*+) en el LCR1 de los 20 pacientes (20/20). En todos ellos se confirmó mediante PCR serogrupo-específica el resultado del serogrupo por aglutinación. Se detectó meningococo (*ctrA*+) en 9/20 LCR2 (control postratamiento). Los 9 LCR2 positivos se obtuvieron en una media de 11 días (rango de 8-14 días) tras la punción diagnóstica, y los 11 LCR2 negativos en una media de 11,9 días (rango de 8-24 días). No se detectó meningococo (*ctrA* negativo) en ninguno de los 66 LCR de los pacientes de los grupos control (31 control A y 35 control B).

Conclusiones: La PCR a tiempo real, realizada directamente del LCR, es una técnica rápida, sensible y específica en el diagnóstico de la meningitis meningocócica. La PCR a tiempo real puede ser de gran utilidad para el diagnóstico etiológico de meningitis abortadas, incluso en pacientes que han recibido un tratamiento antibiótico completo. En la evolución de los pacientes con meningitis meningocócica, un resultado de PCR positivo no tiene valor pronóstico.

619

UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA TÉCNICA ELISA FRENTE A LPS Y ANTÍGENOS PROTEICOS DE BRUCELLA MELITENSIS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA BRUCELOSIS AGUDA

M.A. Mantecón Vallejo, M.P. Gutiérrez, I. Cruz, A. Almaraz, M.F. Moreno, S. Garcinuño, B. Sánchez Borge, M.A. Bratos, A. Rodríguez Torres y A. Orduña

Dpto. Microbiología. Unidad de Investigación. Hospital Clínico Universitario. Valladolid.

Objetivo: Evaluar la validez diagnóstica de una técnica de enzoinmunoensayo (ELISA) frente a LPS de *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* B115 en pacientes con brucelosis aguda.

Material y Métodos: Se han estudiado los sueros iniciales de 51 pacientes con un cuadro clínico de brucelosis confirmada por pruebas de laboratorio. Se consideró suero inicial al obtenido en el inicio de la enfermedad y que sirvió para la realización del diagnóstico de la misma cumpliendo los criterios Del CDC. Se consideraron pacientes con brucelosis aguda a los que tras el diagnóstico y con un tratamiento adecuado evolucionaron favorablemente en un periodo de tres meses. Como grupo control se seleccionaron 412 personas sanas. Tanto en los sueros de pacientes como en los controles, se realizaron las técnicas de ELISA desarrolladas por nosotros para detectar anticuerpos IgG, IgM e IgA frente a LPS de *B. melitensis* 16M, antígeno proteico total de *B. melitensis* 16M y fracciones 1 y 2,3 de antígeno proteico de *B. melitensis* B115. El umbral de positividad se estableció como la media más dos desviaciones estándar de la absorbancia de los 412 sueros del grupo control.

Resultados: La sensibilidad (S) varió entre el 92,2% del ELISA-IgG frente a LPS y el 31,4% alcanzado por el ELISA-IgA frente a la fracción 2,3 del antígeno proteico de *B. melitensis* B115. Las sensibilidades obtenidas por los ELISA frente a LPS y antígeno proteico total fueron superiores a las alcanzadas por las fracciones 1 y 2,3. La especificidad (E) varió poco en todas las pruebas siendo superior, en todos los casos, al 93% alcanzado por el ELISA-IgA frente al antígeno proteico total de *B. melitensis* 16M. Los valores predictivos positivos (VPP) variaron entre el 53,8% del ELISA-IgM frente a la fracción 2,3 hasta el 76,7% del ELISA-IgM frente al antígeno proteico total. Los valores predictivos negativos (VPN) fueron altos y con pocas variaciones. La razón de verosimilitud positiva (RV+) fue mayor de 9,4 y la razón de verosimilitud negativa (RV-) osciló entre el 0,08 del ELISA-

IgG frente a LPS y antígeno proteico total y el 0,7 del ELISA-IgA frente a la fracción 2,3 del antígeno proteico de *B. melitensis* B115.

Conclusiones: Según los resultados obtenidos la técnica más adecuada para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes agudos fue el ELISA-IgG frente al LPS con una S: 92,2%, E: 93,4%, RV+: 14,06 y RV-: 0,08. El ELISA-IgM frente a LPS no diagnosticó al 18% de los pacientes de nuestra serie. (Realizado con una beca y ayuda de la Red Temática Brucellosis G03/204.)

620

ANTICUERPOS FRENTE AL PÉPTIDO C6 (VlsE) DE *BORRELIA BURGDORFERI* S.L. UNA EVALUACIÓN PRELIMINAR

B. Vilar, M.J. López de G. y J. Pérez-Irezábal

Introducción: La reciente caracterización del péptido C6, una fracción altamente conservada e inmunógena de una proteína variable de la superficie de la borrelia (VlsE), y presente en las 3 genoespecies implicadas en la Borreliosis de Lyme (BL) en Europa, se perfila como una alternativa prometedora para el diagnóstico serológico de las diversas formas de la BL.

El **Objetivo** de la presente comunicación es realizar una valoración preliminar de un ELISA basado en la demostración de anticuerpos frente al péptido C6.

Material y métodos: 66 muestras (62 de suero y 4 LCR) pertenecientes a 54 pacientes, fueron obtenidos de nuestra seroteca (congeladas a -20°C, de los años 2001-03); 20 muestras de 13 pacientes con diagnóstico clínico y serológico de BL (Inmunoblot IgG o/y IgM positivo, grupo I.); 23 muestras (20 pacientes) con clínica compatible y serología convencional positiva (ELFA, IFI), pero inmunoblot negativo ó indeterminado (gr.II), y por último 23 muestras de 21 pacientes con otra patología infecciosa: neumonía por Chlamydia (2 pacientes), Fiebre Q (2), F.botonosa (2), Lues (5), Enfermedad por arañazo de gato (EAG, 5), Toxoplasmosis (2) e infección por EBV (3). Todas las muestras fueron procesadas para la demostración de anti-C6 según indicaciones del fabricante (QuickELISA C6 Borrelia kit. Immunetics, LETI)

Resultados: Muestras de 11 de los 13 pacientes (84,6%) del gr.I (4 ECM, 8 neuroborreliosis y 1 artritis), y de 2 de 20 del gr.II (concordancia: 90%) mostraron reactividad sérica frente al antígeno peptídico C6 (los 2 pacientes positivos tuvieron inmunoblot indeterminado). Solamente un paciente del grupo III (con EAG) fué positivo (E:95%)

Conclusiones: Dada la buena sensibilidad (84,6%) y mejor especificidad (95%) obtenida, la detección de anticuerpos anti-C6, se perfila, si se confirman estos resultados, como una alternativa superior a las técnicas de EIA convencional -e IFI- para el cribado serológico de pacientes con sospecha de BL

621

EVALUACIÓN DE UNA NUEVA TÉCNICA DE ELISA (IgG+IgM) PARA EL CRIBADO SEROLÓGICO DE SÍFILIS

C. Freyre, I. Solino, E. Palacios, M.S. García-Valdivia, J.R. León, A. Domínguez, A. Márquez, I. Jesús, S. Pérez-Ramos y M.A. Rodríguez-Iglesias

Lab. de Microbiología, H.U. de Puerto Real. Universidad de Cádiz.

Objetivos: La serología de sífilis es una parte importante de la rutina habitual de los laboratorios de Microbiología. La variedad de técnicas disponibles exigen decidir la pauta más adecuada como cribado en situaciones de bajo riesgo y detectar los casos de sospecha de sífilis. En nuestro laboratorio se utiliza un protocolo que sigue las recomendaciones del PHLS Syphilis Serology Working Group, consistente en emplear un ELISA treponémico de IgG+IgM como cribado y confirmación

mediante TPHA. Hemos evaluado una nueva técnica comercial de ELISA (Bioelisa Syphilis 3.0, Biokit) para la detección conjunta de anticuerpos anti-treponémicos IgG e IgM.

Material y métodos: Se han estudiado 448 muestras de suero, de las cuales 158 eran positivas y 287 negativas. El criterio de positividad se establecía cuando se obtenían reactividad mediante ELISA y confirmación por TPHA (Well-cosyph, Murex). Las muestras discrepantes fueron confirmadas o no como reactivas con inmunoblot (Innolia Syphilis, Innogenetics). Se han evaluado comparativamente dos técnicas comerciales de ELISA: Enzygnost Syphilis (Dade Behring) y Bioelisa Syphilis 3.0 (Biokit).

Resultados: Todas las muestras positivas fueron detectadas por ELISA, excepto 7 de ellas: un falso negativo con Bioelisa Syphilis 3.0 (TPHA negativo e inmunoblot positivo) y 6 falsos negativos con Enzygnost Behring (dos de ellos TPHA negativo e inmunoblot positivo). Entre las muestras negativas solo una presentó reactividad con Bioelisa Syphilis 3.0 y 22 fueron reactivas con Enzygnost Syphilis, aunque 19 de ellas se situaban en zona gris. Las tres muestras positivas de Bioelisa Syphilis lo fueron también por Enzygnost aunque fueron TPHA e inmunoblot negativas. Con estos resultados la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron respectivamente 99,3, 98,9, 98,1 y 99,6 para Bioelisa Syphilis 3.0 y 98,7, 92,4, 87,5 y 99,2 para Enzygnost Syphilis. Las muestras reactivas en zona gris fueron mas numerosas en Enzygnost que en Bioelisa Syphilis 3.0 (6 y 1 en las muestras positivas y 19 y 0 en las muestras negativas, respectivamente).

Conclusiones: Ambas técnicas son adecuadas para el cribado de sífilis en una población de bajo riesgo, sin embargo Bioelisa Syphilis 3.0 obtiene una mejor discriminación entre muestras positivas y negativas, con muy pocas reacciones de interpretación dudosa.

622

DETECCIÓN DE ANTÍGENO EN ORINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍA NEUMOCÓCICA (NN) EN ADULTOS CON ALTA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES DE BASE

M. Segura*, A. Ramírez*, C. Lloret*, J. Gil*, E. Alcoceba*, A. Campins** y J.L. Pérez*

*Servicio de Microbiología y **Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Son Dureta.

Introducción: El diagnóstico de la NN adolece de baja sensibilidad en hemocultivo y dificultad en la interpretación de los cultivos respiratorios. *Binax Now S. pneumoniae test* es una técnica de inmunocromatografía (ICT) en membrana que detecta antígeno polisacárido C neumocócico.

Objetivos: Evaluar el rendimiento del método de ICT en el diagnóstico de la NN en una población adulta con alta incidencia de enfermedades de base.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de las características clínicas de 411 enfermos que acudieron a nuestro hospital por probable neumonía en el período febrero 2001 - junio 2003. Se tabularon los resultados de hemocultivos, cultivos respiratorios o serología. El método de ICT se realizó sobre orina no concentrada. Los términos de comparación fueron: a) Neumonía neumocócica bacteriémica NNB; b) probable neumonía neumocócica PNN (10⁶ ufc de *S. pneumoniae* en esputo de calidad más clínica compatible); c) NN ampliada (suma de NNB y PNN).

Resultados: Se constataron 311 casos con enfermedad de base (75%): EPOC (118), VIH+ (77), neoplasia (15), neumo-patías crónicas (26) y otras (75). El rendimiento global de *S. pneumoniae* fue: ICT 73/411; hemocultivo 31/391; cultivos respiratorios 37/267. En la NNB los resultados de sensibilidad y especificidad fueron para la ICT del 87% (27/31) y del 89,5% (324/362); para el esputo del 17,3% (4/23) y del 90,6%(299/330). Para los subgrupos clínicos de EPOC y VIH+ la especificidad fue respectivamente del 91,3%

(95/104) y del 92,4% (61/66). Considerando el criterio ampliado de NN la sensibilidad y especificidad fue: hemocultivo 53,4% y 100%, ICT 77,6% y 91,2% y esputo 62% y 96,2%. Los resultados falsos positivos de la ICT fueron: neumonía no neumocócica 2/46, bronquitis aguda/ reagudización EPOC 3/64 y patología no infecciosa 1/42.

Conclusiones: 1) En población adulta con alta prevalencia de enfermedad de base La ICT es un método simple y rápido de diagnóstico de NN. 2) En los subgrupos EPOC y VIH+, que se asocian a infecciones neumocócicas de repetición y alta colonización orofaríngea por *S. pneumoniae*, la especificidad de la prueba fue superior al 90%. 3) Con el criterio ampliado de NN la ICT resultó el método más sensible de diagnóstico, aportando 9 casos adicionales al hemocultivo. 4) A pesar de las técnicas microbiológicas utilizadas el diagnóstico etiológico de neumonía sólo se alcanzó en el 37%.

623

INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA SOBRE LEVADURAS NO-*ALBICANS*

M. Romero, E. Cantón, J. Pemán y M. Gobernado

Objetivos: Estudiar la influencia del medio de cultivo en la actividad de caspofungina sobre levaduras no-*albicans*.

Material y métodos: En este estudio se incluyeron 144 cepas de levaduras no-*albicans* aisladas de hemocultivos, de las siguientes especies: *C. glabrata* (32), *C. guilliermondii* (11), *C. krusei* (21), *C. parapsilosis* (20), *C. tropicalis* (42), *C. famata* (4), *C. inconspicua* (1), *C. lambica* (1), *C. lusitanae* (3), *C. sake* (1), *B. capitatus* (3), *P. ohmeri* (1), *S. cerevisiae* (2), *Y. lipolytica* (2). La actividad de caspofungina se determinó por el método de microdilución siguiendo las recomendaciones del NCCLS recogidas en el documento M27-A2 (inóculo de 10^3 ufc/ml y lectura visual de los resultados tras 48 horas de incubación a 35 °C) en dos medios de cultivo, RPMI 1640 y AM#3. Se definieron la CMI₂ y la CMI₀ como la mínima concentración de antifúngico que produjo una reducción del crecimiento $\geq 50\%$ y del 100%, respectivamente, con respecto al crecimiento control.

Resultados: La media geométrica de la CMI₂ (mg/L) en RPMI/AM#3 fue: 0,65/0,09 para *C. glabrata*, 1,07/0,2 para *C. guilliermondii*, 1,39/0,2 para *C. krusei*, 1,62/0,26 para *C. parapsilosis*, 0,59/0,06 para *C. tropicalis* y 1,12/0,17 para el grupo misceláneo. La media geométrica de la CMI₀ en RPMI/AM#3 fue: 1,51/0,14 para *C. glabrata*, 5,48/0,56 para *C. guilliermondii*, 1,87/0,30 para *C. krusei*, 2,73/0,33 para *C. parapsilosis*, 0,86/0,07 para *C. tropicalis* y 2,67/0,23 para el grupo misceláneo. La media geométrica de la CMI₂ y de la CMI₀ disminuyó entre 5 y 12 veces en el medio AM#3. *C. tropicalis* y *C. krusei* fueron las especies con mayor y menor aumento de la media geométrica de ambas CMI, respectivamente. Las cepas que tuvieron las CMI más altas fueron las mismas en ambos medios (*C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*).

Conclusiones: La actividad de caspofungina es mayor en el medio AM#3. No obstante, los valores de las CMI son paralelos en los dos medios de cultivo estudiados.

624

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE DERMATOFITOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA VERSUS MICRODILUCIÓN.

C. Castro, M. C. Serrano, R. Claro, M. Ramírez, E. López, S. Bernal, A.J. Carrillo-Muñoz* y E. Martín-Mazuelos

Servicio de Microbiología H. U. Valme, Sevilla. *Departamento Microbiología ACIA Barcelona.

Objetivo: Comparar la sensibilidad de diferentes especies de dermatofitos a voriconazol (V) por el método de difusión en placa (D-P) y el método de referencia de microdilución (MD) (NCCLS M38-A).

Material y métodos: Hemos estudiado 93 cepas de dermatofitos (53 *T. mentagrophytes*, 15 *T. rubrum*, 11 *M. gypseum*, 7 *M. canis* y 7 otras especies de dermatofitos) aislados de muestras clínicas. La CMI fue determinada siguiendo el documento de referencia NCCLS M38-A. El rango de concentraciones ensayadas fue de 0,003 a 16 (mg/l) para voriconazol. El inóculo inicial se realizó a partir de cultivos puros, en placas de agar patata dextrosa (APD), incubadas durante 7 días a 35°C. Este se realizó cubriendo las colonias con Tween® 80 y arrastrando la colonia con un asa estéril para obtener una suspensión con turbidez equivalente a 0,5 McFarland. El disco utilizado para el método de difusión en placa es V 1 µg (disco de Becton Dickinson®). Las cepas control utilizadas han sido: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Resultados: Las distintas especies estudiadas presentaron un rango de CMI y una CMI_{50/90} de 0,03 a 0,5 (mg/l) y 0,125/0,25 (mg/l) para *T. mentagrophytes*; 0,06 a 0,5 (mg/l) y 0,125/0,5 (mg/l) para *T. rubrum*; 0,06 a 1 (mg/l) y 0,25/1 (mg/l) para *M. gypseum*; 0,03 a 0,25(mg/l) y 0,06/0,12 (mg/l) para *M. canis* y 0,03 a 4 (mg/l) y 0,5/4 (mg/l) para otras especies de dermatofitos (*E. floccosum*, *S. brevicaulis*, *T. interdigitale* y *T. tonsurans*). El 94,6% de las especies estudiadas presentaron un halo de inhibición = 20mm mostrando todas ellas valores de CMI < 1 (mg/l). 5 cepas presentaron un halo < 20 mm de las cuales sólo 2 mostraron valores de CMI <1 (mg/l) (1 *T. mentagrophytes* y 1 *T. rubrum*), y el resto (1 *M. gypseum*, 1 *S. brevicaulis* y 1 *T. interdigitale*) presentaron CMI = 1 (mg/l).

Conclusiones: 1. La correlación halo de inhibición y CMI fue del 96,7%. 2. El método de difusión podría ser una técnica de "screening" útil en el estudio de sensibilidad a los antifúngicos en hongos dermatofitos. 3. Más estudios son necesarios incluyendo cepas con altos valores de CMI.

625

PLATelia ASPERGILLUS: COMPARACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE DISTINTOS PUNTOS DE CORTE DEL ÍNDICE DE GALACTOMANANO EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA ASPERGILOSIS INVASORA

N. Aparisi, S. Cantero, M.P. Bosch, J. Pemán, M.D. Gómez, I. Jarque, M. Salavert, M.A. Sanz y M. Gobernado

Servicios de Microbiología, Hematología y Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Introducción: La detección de galactomanano (GM) en suero se considera una prueba útil para el diagnóstico precoz y seguimiento de la aspergilosis invasora (AI). La sensibilidad (S) y la especificidad (E) de la técnica empleada (*Platelia Aspergillus*®) en una serie de pacientes hematológicos de nuestro hospital fue 66,6% y 96,6%, respectivamente, considerando positivos los sueros con índice DO > 1,5. Diversos autores han sugerido que la sensibilidad de la técnica puede aumentar si se utilizan puntos de corte inferiores (p. ej., DO > 0,5).

Objetivo: Conocer si el empleo de puntos de corte inferiores a los recomendados por el fabricante (1,5) mejora la sensibilidad de la técnica *Platelia Aspergillus*® sin perder la especificidad de la misma.

Material y métodos: Durante el período de julio a diciembre de 2003 se estudiaron prospectivamente todos los pacientes adultos neutropénicos del Servicio de Hematología. Se obtuvieron sistemáticamente dos muestras semanales de 5 ml de suero mientras los pacientes permanecieron hospitalizados y una muestra semanal después del alta en los pacientes que seguían en riesgo de AI. La técnica se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. La AI se consideró posible, probable o probada según los criterios de la EORTC-MSG (la positividad de GM no se usó como criterio diagnóstico). Los casos de AI posible no se incluyeron en el análisis estadístico.

Resultados: Durante el período del estudio se obtuvieron 704 sueros de 120 pacientes. En 13 pacientes (10,8%) se diagnosticó AI probable o probada. En 116 determinaciones (16,4%) correspondientes a 25 pacientes se obtuvo un índice DO >1,5 (S: 46,15%, E: 82,24%, VPP: 24% y VPN: 91,58%). Un índice DO > 1 se obtuvo en 143 determinaciones (20,3%) de 28 pacientes (S: 53,85%, E: 85,98%, VPP: 25% y VPN: 93,48%). Un índice DO > 0,5 se obtuvo en 214 determinaciones (30,4%) de 37 pacientes (S: 76,92%, E: 74,77%, VPP: 27,03% y VPN: 96,39%).

Conclusiones: Independientemente del punto de corte empleado, el VPN obtenido es elevado (>91%). La disminución del punto de corte de la técnica aumenta notablemente la sensibilidad a expensas de una pérdida de especificidad, mayor cuanto más bajo es el punto de corte. En nuestro medio, un índice DO > 1 sería apropiado para el diagnóstico de AI en enfermos hematológicos.

626

NUEVO SISTEMA ADVIA-CENTAUR Y VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)

M.D. Gómez, M.J. Giménez, A. Gil, J.M. Sahuquillo y M. Gobernado

Objetivo: La aplicación de la quimioluminiscencia a las técnicas de inmunoanálisis ha dado lugar a la aparición de nuevos sistemas de inmunoquimioluminiscencia (IQL) para el diagnóstico o determinación del estado inmunológico de distintos agentes infecciosos. Uno de estos sistemas de IQL es el ADVIA-Centaur de Bayer. Nuestro objetivo es compararlo con las técnicas utilizadas en nuestro Servicio para la determinación del AgHBs, anticuerpos anti-HBs y anti-HBc.

Material y métodos: Para el AgHBs se compararon 966 sueros con la técnica AxSYM de Abbott. Aquellos sueros en que se procedió a la neutralización del AgHBs se realizaron por IMX de Abbott. En el anti-HBs fueron estudiados 383 sueros y para el anti-HBc 273. Estos dos marcadores se compararon con la técnica de EIA de microplaca de DiaSorin. Los sueros utilizados fueron tanto de rutina como de nuestra seroteca, en el caso de los sueros de donantes de sangre sanos se obtuvieron del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana.

Resultados: De los 966 sueros estudiados para el AgHBs 110 eran AgHBs(+), 16 AgHBs(+débil) y 850 AgHBs(-) de ellos 477 pertenecían a donantes de sangre. De los 16 (+débil) cuando se realizó la técnica de neutralización 12 no se neutralizaron; cuando se procesaron por IQL los 4 que se neutralizaron fueron positivos y de los 12 que no se neutralizaron sólo uno fue positivo. Al comparar la totalidad de los sueros se obtuvo una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100%. En la evaluación del anti-HBs se compararon 245 sueros (<10 mUI/ml) y 138 (>10 mUI/ml). Cuando se correlacionaron los títulos obtenidos por las dos técnicas comparadas se obtuvo un $r^2 = 0,97$. La sensibilidad fue de un 98,4% y la especificidad de un 97,9% en la determinación de los anti-HBc de los sueros estudiados. Para este marcador serológico 130 eran anti-HBc(-) y 143 anti-HBc(+).

Conclusión: Los resultados de la evaluación indican que el nuevo sistema ADVIA-Centaur (IQL) puede considerarse un buen método para la determinación de los marcadores serológicos del VHB.

627

NUEVO SISTEMA ADVIA-CENTAUR, VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) Y VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

M.J. Giménez, M.D. Gómez, J.M. Sahuquillo, A. Gil y M. Gobernado

Objetivo: El ADVIA-Centaur de Bayer es un sistema de inmunoquimioluminiscencia (IQL) que ha incorporado recientemente la determinación de anticuerpos frente al VHC y

VIH. Nuestro objetivo es compararlo con las técnicas utilizadas de habituales en nuestro Servicio para la determinación de dichos marcadores serológicos.

Material y métodos: En la determinación de los anti-VHC se compararon 503 sueros con la técnica de EIA en microplaca de INNOTEST IV (INNOGENETICS), también se utilizó para aquellos sueros con valores de densidades ópticas (D.O.) dentro del rango de $\pm 10\%$ del *cut-off*, la determinación por AxSYM de Abbott y la confirmación de aquellos sueros que fueron positivos se realizó por INNOLIA IV de INNOGENETICS. En la determinación de los anti-VIH fueron estudiados 203 sueros y se compararon con la técnica de EIA en microplaca de Dade-Behring, aquellos sueros con un valor de D.O. $\pm 10\%$ del *cut-off* o positivos se repitieron por HIV-DUO IV (bioMérieux) y todos se confirmaron por INNOLIA IV (INNOGENETICS). Los sueros utilizados fueron tanto de rutina como de seroteca.

Resultados: De los 503 sueros estudiados para anti-VHC, 285 eran anti-VHC (-) y 218 anti VHC(+). Al comparar los resultados obtenidos por ADVIA-Centaur con los resultados finales según protocolo seguido en nuestro Servicio se obtuvo una sensibilidad del 99,1% y una especificidad del 99%. En la evaluación de los anticuerpos anti-VIH se compararon 100 sueros anti-VIH(-) y 103 ANTI-VIH(+). Tras comparar los resultados obtenidos según el protocolo seguido en nuestro Servicio con los de ADVIA-Centaur obtuvimos una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99%.

Conclusión: Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos tras la evaluación del nuevo sistema ADVIA-Centaur (IQL) para la determinación de los anticuerpos frente al VHC y VIH hacen que pueda considerarse un buen método para la determinación de estos marcadores serológicos.

628

CINÉTICA VIRAL PRECOZ DEL VIRUS C Y PREDICCIÓN DE NO RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON PEG-INTERFERON Y RIBAVIRINA: ESTUDIO COMPARATIVO EN PACIENTES CON Y SIN COINFECCIÓN POR VIH Y GENOTIPOS 1/4

A. Moreno, L. Moreno, S. García-Garzón, C. Queda, R. Bárcena, M.J. Pérez-Eliás, M.L. Mateos, A. Muriel, J. Zamora, A. Antela, J.L. Casado, F. Dronda, E. Navas y S. Moreno

Introducción: En pacientes mono infectados, una PCR VHC (+) al 6º mes de tratamiento con peg- interferon/ribavirina se correlaciona con fallo terapéutico. Medir la caída viral precoz puede identificar a los no respondedores. Si la cinética viral es similar en la coinfección VIH está por determinar.

Objetivos y métodos: Estudio prospectivo y comparativo de la cinética viral precoz, respuesta al 6º mes, y predictibilidad de la no respuesta según la caída viral en la semana 4 en 106 pacientes naïve con genotipos 1 (n = 98) o 4 (n = 8), mono infectados (n = 70) o coinfectados por VIH (n = 36). Se midió el RNA VHC basalmente y en las semanas 4, 12 y 24. Mediante curvas ROC se determinó el punto de corte de caída viral en la semana 4 capaz de determinar con la máxima sensibilidad el fracaso al 6º mes. Los factores basales predictores de fracaso se evaluaron mediante análisis uni y multivariable.

Resultados: A pesar de cargas virales basales similares de virus C (5,75 vs 5,71 log10 UI/ml, p = 0,6), los pacientes mono infectados obtuvieron una respuesta significativamente mejor a las 24 semanas (60 vs 36%, p = 0,02), y valores de RNA significativamente menores en las semanas 4 (3.7 vs 4.1 log10, p = 0,02), 12 (2.3 vs 3.5 log10, p = 0,01) y 24 (1.4 vs 3.2 log10, p = 0,001). Los puntos de corte de caída viral a la semana 4 con la máxima sensibilidad para predecir el fracaso al 6º mes fueron 1 log10 en mono infectados (20/28, 71%; S 100%, E 74%, VPP 85%, VPN 100%), área de la curva ROC 0,96 (IC 95% 0,92-1.00, p 0,0001) vs 0 log 10 (no caída o ascenso) en pacientes coinfectados (8/23, 35%; S 100%, E 83%, VPP 76%, VPN 100%), área de la curva ROC 0,79 (IC 95% 0,63-0,95, p 0,004). Tras análisis uni y multivariable, sólo la

coinfección por VIH (OR 3, IC 95% 1.3-7.0, $P = 0,01$) se asoció de forma independiente al fracaso a las 24 semanas.

Conclusión: En pacientes con hepatitis C (monoinfectados o coinfectados por VIH) en tratamiento con peg-interferón-alfa 2b y ribavirina existe correlación entre la caída precoz del virus C y el fracaso terapéutico a las 24 semanas. La existencia de diferencias significativas en la cinética viral y en los puntos de corte asociados al fracaso sugieren que el aclaramiento del VHC es significativamente más lento en el paciente VIH. La coinfección por VIH es un factor independiente de fracaso.

629

COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANTIGENEMIA CMV Y PCR COBAS AMPLICOR CMV MONITOR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CMV EN SANGRE EN PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS

G. Rubio, L. López, I. Martínez e I. López

Objetivo: Comparar dos técnicas de cuantificación de Citomegalovirus (CMV) en sangre, antigenemia y PCR (PCRc), en pacientes trasplantados hepáticos (TOH).

Métodos: Estudiamos 17 pacientes TOH, operados en nuestro hospital de forma consecutiva, a partir de marzo de 2000. Todas las muestras de sangre de estos pacientes, obtenidas durante un año, fueron analizadas por ambos métodos. La antigenemia se realizó por inmunofluorescencia indirecta (CINAKit-Rapid antigenemia, Argene), la extracción de las células se hizo con dextrano 6% y el resultado fue cuantificado por el número de células infectadas/200.000 leucocitos. La PCRc se realizó en plasma, por el método Cobas Amplicor CMV Monitor (Roche) y los resultados se expresaron en nº de copias/ml. Para la comparación de los resultados obtenidos por las dos técnicas, se ha calculado la recta de regresión y el coeficiente de correlación **R** de Spearman.

Resultados: El número total de muestras estudiadas fue de 210. De los 17 pacientes, 12 (70,5%), con un total de 127 muestras analizadas, fueron siempre negativos. Un paciente, 10 muestras estudiadas, tuvo una sola determinación positiva por PCRc siendo siempre negativo por antigenemia. En los 4 pacientes restantes, 73 muestras analizadas, en 48 ocasiones dio negativo por las dos técnicas; positivo por ambas en 13; antigenemia positivo-PCRc negativo en 7 y antigenemia negativo-PCRc positivo en 5. Los 17 pacientes fueron IgG CMV positivos pretrasplante. El coeficiente de correlación **R** de Spearman fue 0,6148, $p < 0,001$.

Conclusiones: Según nuestra experiencia, podríamos considerar ambos procedimientos equivalentes, en cuanto a su utilidad para el diagnóstico de la infección activa por CMV, en este grupo de pacientes, si no fuera porque, el coste de la PCRc es aún muy elevado y la antigenemia (no exenta de problemas) goza de una dilatada experiencia en la práctica virológica.