

Sesión 11: Métodos moleculares de diagnóstico

161

DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS VÍRICAS MEDIANTE UNA PCR MULTIPLEX

R. Ortiz de Lejarazu, A. Tenorio, J.M. Eiros, M. Moreno,
M. Domínguez-Gil, S. Rojo, I. Gracia y T. Vega
*Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de
Valladolid.*

Introducción: Las infecciones respiratorias son la primera causa de infecciones ambulatorias y constituyen una importante causa de ingreso hospitalario. Muchas de dichas infec-

ciones reconocen una etiología vírica, el conocimiento del agente causal es importante para evitar tratamientos antibióticos innecesarios y adelantar un pronóstico u otras indicaciones terapéuticas.

Objetivos: Evaluar el rendimiento diagnóstico de infecciones respiratorias víricas mediante la técnica RT-PCR multiplex.

Material y métodos: Se analizaron un total de 155 muestras (139 frotis faríngeos y 16 lavados broncoalveolares) recibidas entre Octubre del 2005 y Mayo del 2006 en el laboratorio de virología, procedentes de pacientes hospitalizados (67,75%) y ambulatorios (32,25%). Las muestras fueron procesadas por cultivo celular (MDCK, A549, Hep2 y mezcla) y se hicieron alícuotas destinadas a los distintos análisis, manteniéndolas a -80°C. Posteriormente todas las muestras se procesaron por dos multiplex PCR, dirigida una de ellas (RT-PCR multiplex 1), a la detección de Gripe A, Gripe B, Gripe C, RSV A, RSV B y ADV; y la otra (RT-PCR multiplex 2) para PIV-1, PIV-2, PIV-3, PIV-4, Rinovirus, Enterovirus, Coronavirus 229E y OC43.

Resultados: Mediante cultivo celular convencional se aislaron 43 virus respiratorios con la siguiente distribución: 9 Gripe A, 15 Gripe B, 4 RSV y 15 ADV. El análisis por RT-PCR multiplex, detectó 66 virus: 3 FluA, 13 FluB, 2 RSV A, 8 RSV B, 26 ADV, 1 PIV-1, 1 PIV-2, 1 PIV-3, 1 PIV-4, 4 Rinovirus y 6 Enterovirus. El rendimiento diagnóstico de la RT-PCR es significativamente superior, con un incremento de aislados víricos del 53,48%. No obstante hay que señalar la insuficiencia en cuanto a la detección del virus de la gripe, y en particular el tipo A.

Conclusión: De acuerdo a los resultados obtenidos, la RT-PCR multiplex podría complementar a las técnicas tradicionales, aportando rapidez y mayor espectro diagnóstico en infecciones respiratorias de etiología vírica. Además, la PCR permite diferenciar brotes nosocomiales procedentes de los dos tipos de RSV (A y B).

162

RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS TOSCANA

M. Pérez-Ruiz¹, X. Collao², S. Sanbonmatsu³, J.M. Navarro-Mari¹ y A. Tenorio²

¹Servicio de Microbiología. H.U. Virgen de las Nieves. Granada.

²Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas.

³Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid. ³Hospital Santa Ana. Motril. Granada.

El virus Toscana (VTOS, *Phlebovirus, Bunyaviridae*) es un importante agente productor de meningitis aséptica, hoy día sólo precedido por enterovirus en nuestro medio. Se han descrito al menos dos linajes genéticos de VTOS, el linaje español y el linaje italiano, en base a la variabilidad genética encontrada en el gen N y L entre cepas de ambas regiones. No todas las técnicas moleculares anteriormente descritas permiten detectar ambos linajes del virus. Hemos desarrollado una RT-PCR en tiempo real (PCR-TR) para la detección de los linajes español e italiano de VTOS. Se seleccionó una región conservada del extremo 3' del segmento S ("small") del genoma viral. La RT-PCR amplificaba un fragmento del gen N, y la detección se realizó con una sonda Taqman® mediante medida de la fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación. Para evitar falsos resultados negativos, se construyó un control interno (CI) cuyos extremos 5' y 3' eran complementarios a los cebadores diseñados para la PCR-TR y cuya región interna es inespecífica e híbrida con otra sonda Taqman® marcada con otro fluoróforo. La PCR-TR se llevó a cabo en un LightCycler v1.0 (Roche Diagnostics) y la lectura de la fluorescencia en cada ciclo se realizó en diferentes canales del aparato según se tratara de detectar VTOS o CI. Se evaluaron los siguientes parámetros: sensibilidad, con diluciones de una cepa española de VTOS utilizada en paralelo para la PCR-TR y para cálculo de la TCID₅₀ en línea celular Vero; especificidad, con cepas VTOS italiana y españolas, con

otros phlebovirus y con otros virus ARN; y error intra e interensayo, midiendo la variación en el ciclo umbral de detección en determinaciones repetidas en una misma PCR y determinaciones repetidas en diferentes PCRs, respectivamente. La PCR-TR desarrollada demostró una sensibilidad de 0,0158 TCID₅₀. Tanto la cepa italiana como los aislados españoles amplificaban eficientemente mediante la PCR-TR. No se detectó ningún otro phlebovirus ni virus ARN. El coeficiente de variación intraensayo fue de 0,4%. El error interensayo osciló entre 0,8 y 1,14% según la concentración inicial de ADNc de VTOS. La PCR-TR desarrollada para detectar VTOS es una técnica sensible, específica y reproducible, y puede ser aplicada al diagnóstico rápido de meningitis por VTOS.

163

FILOGENIA Y DISTRIBUCIÓN BIOGEOGRÁFICA DEL GENOTIPO G9 DEL ROTAVIRUS: POSIBLE EXPLICACIÓN DE SU ORIGEN Y EVOLUCIÓN

J. Martínez-Laso^{1,2}, A. Román^{1,2}, J. Head¹, E. Culebras², I. Rodríguez-Avial², M. Rodríguez¹ y J.J. Picazo²

¹Unidad de Inmunoterapia Celular. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. ²Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Clínico de San Carlos.

La infección por rotavirus es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. La obtención de una vacuna efectiva es crucial para la reducción de defunciones, hospitalizaciones y las enfermedades derivadas de este patógeno. De los cinco genotipos G (VP7) (G1-G4 y G9) del grupo A de rotavirus, G9 continúa siendo de considerable interés debido a una historia evolutiva única. Este genotipo fue aislado en los años 80 y re-apareció a mediados de los 90 con un genotipo de características genéticas y moleculares diferentes sin una explicación clara. En el presente estudio, se secuenciaron 5 genotipos G9 pertenecientes a pacientes españoles de un estudio multicéntrico y se compararon con un total de 224 genotipos G (211 G9 humanos, 8 G9 porcinos y 5 de diferentes genotipos G1-G5). Se realizaron árboles filogenéticos Neighbour-Joining para los estudios evolutivos y se estudió la distribución biogeográfica de las distintas secuencias G9 analizadas. Se establecen tres nuevos linajes genéticos diferentes a los descritos previamente basados en su evolución respecto a los del cerdo. Además, se encontró una coincidencia entre los nuevos linajes descritos y su distribución biogeográfica. Estos resultados dan la posibilidad del establecimiento del origen y evolución de las diferentes variantes del genotipo G9 del rotavirus.

164

MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DE LAS VARIANTES DEL GENOTIPO G3 DEL ROTAVIRUS HUMANO

J. Martínez-Laso^{1,2}, A. Román^{1,2}, J. Head¹, I. Rodríguez-Avial², E. Culebras², M. Rodríguez¹, P. Fuentes¹ y J.J. Picazo²

¹Unidad de Inmunoterapia Celular. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. ²Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Clínico de San Carlos.

Se ha descrito que el rotavirus evoluciona mediante múltiples mecanismos genéticos. El más común suele ser la acumulación de mutaciones puntuales en su genoma aunque otros mecanismos como inserciones, delecciones o conversión génica también participan en el proceso de generación de los distintos alelos de cada genotipo. Por otra parte, la infección a humano de diferentes especies animales puede generar distintas variantes o linajes del mismo genotipo. Uno de los genotipos más interesantes en la acumulación de los factores nombrados anteriormente es el G3 que incluso ha presentado distintos parámetros de determinación antigenica. En el presente trabajo se compararon 165 secuencias de los geno-

tipos principales (G1-G5, G8, G9 y G11) de diferentes especies (humano, cerdo, bovino, caballo, mono rhesus y conejo) para el estudio de evolución del genotipo G3. Los resultados obtenidos demuestran: 1) Se establecen distintos linajes o subtipos genéticos del genotipo G3 en función de la especie que ha producido la infección, 2) reasignación de variantes G3 que en realidad son G4, G5 o G8 y 3) mecanismos de conversión génica de G1 y G2 sobre G3 para la creación de nuevos alelos. Estos resultados ponen de manifiesto que para estudios epidemiológicos, de generación de vacunas o asociación de sintomatología clínica es necesario la realización de este tipo de estudios de evolución genética. Como se demuestra son mucho más resolutivos que la determinación antigenica o por RT-PCR. Además, el presente estudio se constituye como una base para la comparación de los datos obtenidos en futuras investigaciones.

165

DETECCIÓN Y TIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN MUESTRAS GENITALES

M. Domínguez-Gil, R. Ortiz de Lejarazu, J.M. Eiros, M. Moreno, I. Gracia, A. Tenorio, C. Labayru, M. Ortega y B. Hernandez

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Introducción: La amplia variedad de técnicas disponibles para la detección y tipado del Virus del Papiloma Humano (VPH), demuestra que ninguna de ellas de manera individualizada aporta una solución completa y definitiva para este fin.

Objetivo: Explicar la correlación diagnóstica entre las técnicas empleadas para detectar ADN de VPH y tipado en muestras genitales de mujeres con sospecha de lesión por VPH.

Métodos: Se seleccionaron 50 muestras genitales en las que se evidenció la presencia de VPH mediante el ensayo de captura de híbridos (Hybrid Capture II, Digene). Se analizó la concordancia entre estos resultados y los obtenidos por PCR y posterior tipado por digestión con enzimas de restricción; PCR RLFP (HPV fast, Genomica). Se compararon estos resultados con los obtenidos al realizar el tipado mediante el equipo *Papilomavirus Clinical arrays* (Genomica).

Resultados: Los resultados obtenidos por hibridación se distribuyeron como sigue: 50% de las muestras fueron positivas para VPH de alto riesgo, 10% de bajo riesgo, 40% para ambos tipos. Mediante PCR RLFP se detectó la presencia de ADN de VPH en 40% de las muestras analizadas (N = 50). Mediante el empleo de microarrays se detectó ADN de VPH en 90% de las muestras analizadas. El 40% de las de moderado-alto riesgo no fueron detectadas por PCR. El 20% de las de alto riesgo no se detectaron por microarrays. El 100% (N = 5) de las de bajo riesgo y el 75% (N = 20) de las positivas para ambos grupos de VPH no fueron detectadas por PCR. El 100% de las de bajo riesgo y el 100% de las de ambos grupos fueron detectadas por microarrays. Mediante PCR se detectaron 5 infecciones mixtas, mientras que con los microarrays se detectaron 15. El tipo 16 fue el VPH más frecuentemente identificado. Apareciendo en 20 ocasiones mediante PCR y en 24 ocasiones mediante microarrays.

Conclusiones: La detección de ADN de VPH por hibridación se asocia con un mayor porcentaje de resultados positivos que en la PCR. Sin embargo existen mayores concordancias entre hibridación y microarrays. La PCR parece no detectar un número significativo de resultados positivos, detectando un número mayor de las de alto riesgo. Hay una mejor correlación entre microarrays e hibridación para la detección y tipado de VPH y mayores discrepancias entre PCR e hibridación. También se observó como mediante el empleo de microarrays se detectan un mayor número de infecciones mixtas que con la PCR.

166

UTILIDAD DE LA CARGA VÍRICA EN TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN PERINATAL POR VIH-1

A. Hernández¹, C. Rodrigo², G. Fernández¹, M. Azuara², C. Morato¹, M. Carrasco¹ y L. Matas¹

¹Servicio de Microbiología. ²Servicio de Pediatría. Hosp. Univ. Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

Introducción: El diagnóstico precoz de la infección perinatal por HIV-1 es esencial para el inicio del tratamiento anti-rretroviral y de la profilaxis frente a las infecciones oportunistas. Según el criterio de los CDCs se requiere, en niños menores de 18 meses, 2 resultados positivos en 2 muestras de sangre, obtenidos con una técnica de detección directa del virus. La PCR de DNA o RNA son las pruebas más utilizadas. Sin embargo, la PCR de DNA del VIH presenta falsos positivos y negativos. La cuantificación del RNA de HIV-1 (carga vírica) en tiempo real es una técnica más sensible y reduce la posibilidad de falsos positivos.

Objetivo: Evaluar la sensibilidad y especificidad de la carga vírica de HIV-1 mediante el método NASBA en tiempo real para el diagnóstico de infección perinatal.

Material y métodos: Desde septiembre de 2004 a diciembre de 2006 se estudiaron de forma prospectiva a todos los niños hijos de madres HIV+ nacidos en nuestro hospital. Todos recibieron profilaxis con AZT durante las primeras 6 semanas de vida. Las muestras de plasma se obtuvieron al nacimiento y al 1º, 2º, 3º y 6º meses de vida. La serorreversión de anticuerpos anti-HIV se comprobó a los 9-18 meses de vida. La extracción de RNA se realizó mediante el sistema automatizado NucliSens (NucliSens Extractor y NucliSens Easy Mag) y posterior amplificación y detección con el sistema NucliSens EasyQ. El volumen de muestra procesada fue de 200 µl y el límite de detección de la técnica de 250 UI/ml. Los resultados de carga vírica (CVP) se compararon con el estado serológico y situación clínica a los 12-18 meses de vida de los niños.

Resultados: Se procesaron 75 muestras de CVP de 24 niños. De éstos, solo uno fue diagnosticado de infección perinatal por HIV-1, con CVP de 1.100 y 2.600 UI/ml al mes y 2 meses de vida, respectivamente. En los niños no infectados todas las determinaciones de CVP realizadas tuvieron valores indetectables (< 250 UI/ml), excepto en un caso de falso positivo (4.200 UI/ml). La sensibilidad de la CVP al 1, 4 y 6 meses de vida fue del 100% y la especificidad del 100, 98,6 y 100%, respectivamente.

Conclusiones: La CVP en tiempo real del VIH-1 es una técnica con una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infección perinatal por HIV-1 en niños en los primeros 6 meses de vida. No obstante, la detección de bajos niveles de CVP pueden no ser reproducibles y deben interpretarse con cautela.

167

UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE DNA DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN PLASMA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS NO HODGKINIANOS Y HODGKIN EN PACIENTES INFECTADOS POR EL HIV

A. Hernández¹, J.T. Navarro², J. Rodríguez-Manzana¹, J. Grau², M. Morgades², J.L. Mate³, C. Tural⁴, J.M. Ribera² y L. Matas¹

¹Servicio de Microbiología. ²Servicio de Hematología. Institut Català d'Oncología- Badalona. ³Servicio de Anatomía Patológica. ⁴Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

Introducción: Los pacientes infectados por el HIV (HIV+) tienen un elevado riesgo de desarrollar linfomas, principal-

mente no hodgkinianos (LNH) y también linfoma de Hodgkin (LH). La introducción del TARGA ha supuesto una mejoría del pronóstico de estos linfomas. El virus de Epstein-Barr (VEB) se ha asociado a ambas enfermedades y la cuantificación de su DNA (CV del VEB) por PCR podría ayudar al diagnóstico precoz de estos tumores.

Objetivo: Comparar la CV del VEB en plasma, en pacientes HIV+ con y sin linfoma y valorar su utilidad en el diagnóstico.

Material y métodos: Se estudiaron 113 pacientes adultos HIV+, 39 con linfoma (32 LNH y 7 LH) y 74 sin linfoma. Las muestras de los pacientes con linfoma se obtuvieron en el momento del diagnóstico y antes de empezar la quimioterapia. Todos los pacientes fueron seropositivos para VEB frente a su antígeno capsular (IgG VCA) por inmunofluorescencia. A todos los pacientes se les realizó un recuento de CD4+ por citometría de flujo y cuantificación de RNA de HIV-1 (CV del HIV) por el método NASBA (NucliSens EasyQ HIV- 1). También se analizó la presencia de RNAm EBER-1 de VEB en tejido mediante hibridación *in situ*. Previamente a la realización de la CV del VEB se aisló el DNA a partir de 200 µl de plasma (QIAamp DNA Minikit). La amplificación se realizó mediante PCR en tiempo real (RealArt EBV PCR) para la plataforma LightCycler.

Resultados: Los pacientes HIV+ con linfoma tuvieron una CV del VEB más elevada en el momento del diagnóstico del linfoma (24180 ± 73387 copias/ml) que los pacientes sin linfoma (3 ± 27 copias/ml), siendo esta diferencia estadísticamente significativa cuando se evaluaron los LNH y LH conjuntamente ($p = 0,05$) y por separado ($p = 0,01$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la CV del VEB y el recuento de CD4+, ni entre la CV del VEB y la CV del HIV entre los pacientes con o sin linfoma. La presencia de RNAm EBER-1 en tejido se evaluó en 17 pacientes. La media de CV del VEB de los once pacientes con linfoma EBER- hallados fue de 37.935 ± 124.333 copias/ml y la de los 6 pacientes con linfoma EBER+ de 50652 ± 74671 ($p = 0,02$).

Conclusiones: Los pacientes HIV+ con linfoma tienen una CV del VEB más elevada en el momento del diagnóstico que los pacientes HIV+ sin linfoma. Los pacientes con linfomas EBER+ tienen también una mayor CV del VEB que los pacientes EBER-. En conclusión, la CV del VEB es un marcador útil para el diagnóstico precoz del LNH y del LH en la población HIV+.

168

DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE *FRANCISELLA TULARENSIS* Y COMPARACIÓN CON LA METODOLOGÍA DISPONIBLE

R. Escudero¹, J.F. Barandika², A. Toledo³, K. Kovácsová¹, M. Rodríguez-Vargas¹, C. García-Amil¹, A.S. Olmeda³, A.L. García-Pérez², I. Jado¹, H. Gil¹ y P. Anda¹

¹Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid; ²Dpto. Sanidad Animal, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), Derio, Vizcaya; ³Dpto. Sanidad Animal, Universidad de Veterinaria, UCM, Madrid

Introducción: En la actualidad se necesitan métodos con gran sensibilidad para la detección de *F. tularensis* tanto de muestras clínicas como medioambientales. Por otra parte, los estudios sobre la distribución de *Francisella* en la naturaleza se ven obstaculizados por la presencia de endosimbiotes *Francisella*-like en garrapatas que pueden dar resultados positivos y sobreestimar la frecuencia real de esta bacteria. Este hecho cobra más importancia si se tiene en cuenta la clasificación de *F. tularensis* dentro de la categoría A (CDC) de agentes de potencial uso en bioterrorismo.

Objetivos: El objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto de un método de detección molecular sensible y capaz de discriminar entre subespecies de *F. tularensis* y endosimbiotes *Francisella*-like.

Material y métodos: Por una parte se diseñó una PCR que amplifica un fragmento del gen que codifica TUL4 (*lp-nA*) de *Francisella* spp., seguido de una hibridación inversa (reverse line blotting-RLB) (TUL4-PCR/RLB), para la que se diseñaron dos sondas: una común a las subespecies *F. tularensis tularensis*, *holarctica* y *novicida*, y una sonda genérica para todos los tipos de endosimbiotes descritos. Por otra parte se puso a punto una PCR que amplifica un elemento repetitivo (Rep-Ftt). Los resultados de estas técnicas se compararon con las de las PCRs previamente descritas que amplifican el 16S rRNA y el elemento repetitivo SSTR9. Se estudiaron muestras clínicas procedentes de pacientes con tularemia, así como garrapatas y micromáferos.

Resultados y conclusiones: TUL4-PCR/RLB mostró la mayor sensibilidad en pacientes (100%) comparada con las otras PCRs estudiadas (96% para Rep-Ftt y 88% para 16S rRNA y SSTR9). El RLB mostró un buen poder discriminatorio entre *F. tularensis* y endosimbiotes *Francisella*-like en el estudio medioambiental. La técnica descrita de PCR combinada con RLB permite la detección simultánea de múltiples especies en una misma muestra sin la necesidad de secuenciación, lo que resulta de gran utilidad desde el punto de vista de diagnóstico y de vigilancia.

Financiado por la Red EBATRAG (FIS G03/057) y el proyecto intramural Instituto de Salud Carlos III MPY 1176/06

169

DESARROLLO DE UN MÉTODO MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS

H. Gil¹, A.M. Martín², R. Escudero¹, I. Jado¹, C. García-Amil¹, M. Rodríguez-Vargas¹ y P. Anda¹

¹Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales; Servicio de Bacteriología; Centro Nacional de Microbiología. ²Servicio de Microbiología; Hospital Universitario Insular de Las Palmas de Gran Canaria.

Introducción: La leptospirosis es la zoonosis de más amplia distribución mundial. Esta enfermedad tiene un importante componente ocupacional, siendo los trabajadores en contacto con agua y animales los que padecen más frecuentemente este proceso. Sin embargo, son cada vez más frecuentes los casos relacionados con desastres naturales, como el que se describe en este estudio.

Objetivo: Desarrollo de una técnica molecular para la detección de leptospirosis patógenas y aplicación sobre pacientes con sospecha.

Materiales y métodos: Se empleó como diana de la técnica la lipoproteína LipL32, específica de las leptospirosis patógenas. Para la detección de posibles inhibidores se utilizó un control interno basado en la secuencia del gen que codifica THC de *Cannabis sativa*. El método puesto a punto consistió en una PCR dúplex combinada con una hibridación inversa para la detección específica de LipL32 y el control interno. Para la determinación de la sensibilidad de la técnica se emplearon diluciones de ADN de *L. interrogans* serovar *canicola*, cuyo número de equivalentes de genoma era conocido. Para la especificidad del método se usó ADN de diferentes espiroquetas y otros patógenos. Este método fue usado en el diagnóstico de un paciente de Las Palmas de Gran Canaria, que ingirió agua contaminada durante las inundaciones de 2006, presentando fallo renal compatible con leptospirosis.

Resultados: La técnica puesta a punto presentó una gran sensibilidad y especificidad, llegándose a detectar hasta 10 equivalentes de genoma de *Leptospira* spp. y no se observaron hibridaciones cruzadas con otras espiroquetas o los otros patógenos testados. No se observaron interferen-

cias en el uso del control interno, amplificándose eficientemente esta diana en todos los casos. Las muestras de suero y orina del paciente fueron positivas utilizando el método descrito. Este resultado se confirmó por secuenciación.

Discusión y conclusiones: El método desarrollado posee una buena sensibilidad y especificidad. Su eficacia ha quedado patente en su aplicación sobre muestras clínicas, diagnosticándose un caso autóctono de leptospirosis. De esta forma, el Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales ha incluido en su Cartera de Servicios un método eficaz en la detección de *Leptospira* que se ofrece a los hospitales del Sistema Nacional de Salud.

170

MÉTODO MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE *BARTONELLA*

C. García-Esteban¹, H. Gil², R. Escudero², M. Rodríguez-Vargas², C. García-Amil², J. Barandika³, X. Gerrikagoitia³, I. Jado², S. Kaufman⁴, A. Pérez⁵, S. Jiménez⁵, A. Blanco⁶, M. Barral³, A.L. García-Pérez³ y P. Anda²

¹Servicio de Microbiología del Hospital de Getafe ²Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Servicio de bacteriología. Centro nacional de Microbiología ³Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER Tecnalia) ⁴Hospital Fernández Ciudad de Buenos Aires ⁵Servicio de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental, Consejería de Salud de La Rioja ⁶Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Central de Asturias

Introducción: Dentro del género *Bartonella* se han descrito más de 20 especies que son mantenidas en la naturaleza por medio de diferentes reservorios y vectores. Su estudio clínico y ecológico se ve dificultado por la falta de métodos rápidos y específicos para la diferenciación de las especies pertenecientes a este género. En este estudio se describe un nuevo método molecular con un buen nivel de sensibilidad y especificidad.

Objetivos: Diseño y evaluación de un método molecular para la detección y determinación de la especie de *Bartonella* presente en muestras de diferente origen biológico.

Material y métodos: La técnica puesta a punto consiste en una PCR multiplex basada en el espacio intergénico 16S-23S rRNA y el gen 16S rRNA, junto con cebadores para la amplificación de un control interno (THC de *Cannabis sativa*). Los productos de la PCR multiplex se analizaron mediante hibridación inversa (RLB) con sondas específicas para la detección de las diferentes especies de *Bartonella*. La sensibilidad de la técnica fue determinada con diferentes concentraciones de ADN (1 a 10^3 equivalentes genómicos) de *B. schoenbuchensis* y en presencia o no de ADN foráneo. La especificidad de la técnica se determinó mediante el uso de ADN de diferentes especies de *Brucella* y patógenos transmitidos por artrópodos. La técnica se validó con muestras de diferente origen biológico.

Resultados: La PCR mostró una alta sensibilidad, detectando entre 1 a 10 equivalentes genómicos de *B. schoenbuchensis*. La evaluación con muestras de pacientes y ambientales permitió detectar diferentes especies en las mismas. Cabe destacar un paciente en el que se detectó *B. bovis*, lo que representa la implicación de este patógeno por primera vez en enfermedad humana. Además, se han encontrado cuatro nuevas especies: dos en roedores, una en carnívoros silvestres y otra en garrafas.

Conclusiones: El método puesto a punto permite la detección de *Bartonella* con una alta sensibilidad e identifica el patógeno a nivel de especie, demostrando su eficacia sobre muestras humanas y ambientales. La diversidad genética de *Bartonella* parece mayor de la que inicialmente se pensaba, tras los hallazgos presentados en este estudio.

Trabajo financiado por la RTIC EBATRAG (FIS, G03/057).

171

NEUMONITIS/BRONQUIOLITIS DEL LACTANTE: USO DE LA TÉCNICA PCR, PARA DETECCIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EN EXUDADO NASOFARÍNGEO

A. Rodríguez¹, A. Broseta¹, C. Ardura² y F. Sanz¹

¹S. Microbiología y Parasitología Clínica, ²S. Pediatría. H. U. 12 de Octubre.

Introducción. En los niños de corta edad, la enfermedad respiratoria es una causa importante de hospitalización y morbi/mortalidad. Desgraciadamente, la etiología de las neumonitis/bronquiolitis en los primeros tres meses de la vida no está bien definida, VRS, *Pneumocystis*, *Ureaplasma urealiticum* y *C. trachomatis* se consideran agentes implicados, pero a menudo no se identifica el agente etiológico responsable del cuadro clínico. Desde el año 2004 en el Hospital Universitario 12 de Octubre se utiliza la técnica de PCR para detección de *C. trachomatis* en exudado nasofaríngeo de lactantes hospitalizados que presentan clínica compatible con neumonitis/bronquiolitis. Presentamos nuestra experiencia con esta técnica.

Material y métodos. A 16 niños con clínica compatible con neumonitis/bronquiolitis se les realizó exudado nasofaríngeo, también se realizó exudado endocervical a la madre y ambas muestras fueron procesadas mediante la técnica de PCR (Cobas Amplicor, Roche) para detección de ADN de *C. trachomatis* de acuerdo a las normas de la casa comercial. A los lactantes también se les realizaron tomas para detección de VRS, cultivo de virus y *Bordetella pertussis* así como otras determinaciones de laboratorio rutinarias.

Resultados: De las 32 muestras procesadas, 2 exudados nasofaríngeos y los exudados endocervicales de sus madres fueron positivos en la detección de ADN de *C. trachomatis*. Hubo un tercer exudado nasofaríngeo positivo pero el exudado endocervical fue negativo. Para descartar falso positivo, realizamos detección cuantitativa de anticuerpos Ig G de *C. trachomatis* en suero por la técnica enzimainmunoanálisis a ambos progenitores, resultando el padre positivo. Estos tres niños tuvieron el resto de los estudios microbiológicos realizados negativos.

Conclusiones: Asumimos que nuestra experiencia es muy escasa pero creemos que el resultado del test utilizado para detección de la sospecha de infección por *C. trachomatis* ayudó al manejo clínico de los niños enfermos y confirmó la sospecha diagnóstica. Al mismo tiempo determinó la necesidad del tratamiento de los progenitores en los que se desconocía la infección.

172

NUEVOS PATRONES GENÉTICOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS MEDIANTE PCR-RFLP DEL GEN *HSP65*

R. Cabrera, F. Alcaide y R. Martín

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental. Universidad de Barcelona.

Introducción y objetivo: El aumento del aislamiento de numerosas especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) y la evidencia de la patogenicidad de gran parte de ellas, ha conllevado la necesidad de realizar en el laboratorio una identificación a nivel de especie dentro del género *Mycobacterium*. Una de las principales técnicas para este fin es la PCR-RFLP del gen *hsp65* (PRA). Sin embargo el constante cambio y evolución de estos microorganismos que puede llevar a modificaciones genéticas e incluso la aparición de nuevas especies, ha evidenciado la necesidad de reevaluar los patrones genéticos del PRA en múltiples especies de MNT, incluidas las emergentes.

Materiales y métodos: 1) Microorganismos: se estudiaron 46 aislamientos clínicos (uno por paciente) de MNT. 2) Identificación: a) PRA: basada en la amplificación (PCR) del gen *hsp65* y

la posterior restricción con los enzimas *Bst*EII y *Hae*III. Los diferentes patrones basados en el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos se analizaron en la base de datos PRASITE y con todos los patrones descritos hasta la actualidad; b) Secuenciación del 16S rDNA: comparación en las bases de datos RIDOM y GenBank. La identificación fue considerada correcta con una homología > 98%, mientras que cepas con homologías del 95,5-98% fueron complementadas con diversas pruebas fenotípicas: velocidad y temperatura óptima de crecimiento, fotocromogenicidad y pruebas bioquímicas básicas.

Resultados: Las especies identificadas con más frecuencia fueron: *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium terrae* y *Mycobacterium simiae*. En 26 cepas (56,5%) se detectaron 13 nuevos patrones: *M. mucogenicum* (n = 12; 1 patrón), *M. terrae*, (n = 5; 3 patrones), *M. simiae* (n = 4; 4 patrones), *Mycobacterium alvei* (n = 2; 2 patrones), *Mycobacterium duvalii* (n = 1), *Mycobacterium madagascariense* (n = 1) y *Mycobacterium nonchromogenicum* (n = 1). Todas las diferencias observadas en los nuevos patrones se basaron en los diversos RFLP obtenidos con la enzima *Hae*III.

Conclusiones: Se constata la existencia de nuevos patrones genéticos mediante el PRA en diferentes especies de MNT, incluidas algunas de reciente descripción. Estos patrones no han sido descritos ni se encuentran disponibles en las bases de datos existentes. Por todo ello, es necesario el establecimiento de un consenso global y una actualización continua de dichos RFLP, que permita una adecuada aplicación en la identificación micobacteriológica.

173

MÉTODO PARA LA DETECCIÓN CONJUNTA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS TRANSMITIDAS POR ARTRÓPODOS

P. Anda, R. Escudero, I. Jado, H. Gil e I. Rodríguez-Moreno
Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales; Servicio de Bacteriología; Centro Nacional de Microbiología.

Introducción: Las infecciones bacterianas producidas por picadura de artrópodo producen cuadros clínicos a menudo indistinguibles en su fase inicial y son enfermedades de difícil diagnóstico. Además, no existen métodos comerciales fiables y fáciles de incluir en la rutina hospitalaria. Estos patógenos entran dentro de la categoría de bacterias de cultivo fastidioso y no es infrecuente la transmisión, en una misma picadura, de más de un patógeno. Todo esto aconseja utilizar un acercamiento multiplex para la detección conjunta de este grupo de patógenos.

Objetivos: Desarrollar un método para la detección e identificación en un solo ensayo de especies de los géneros *Anaplasma* / *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*.

Material y métodos: Para cada género seleccionamos las siguientes dianas: 16S rRNA (*Anaplasma* / *Ehrlichia* y *Borrelia*); espacio intergénico 16S-23S rRNA (*Bartonella*), espacio intergénico 23S-5S rRNA (*Rickettsia*), transposasa *IS1111* (*Coxiella*) y *lpnA* (*Francisella*). Se utilizó una PCR Multiplex e hibridación inversa por RLB. Cuando no se disponía de ADN nativo, se construyeron fragmentos sintéticos de ADN mediante PCR consecutivas con cebadores solapantes, que se clonaron en un vector apropiado, determinando el número de copias/volumen para la determinación de la sensibilidad. Para la especificidad, el método se ensayó frente a ADN de especies cercanas (*Chlamydia*, *Legionella*, *Micoplasma*, *Orientia*, *Lepotspira*, *Brucella*, *Ochrobactrum* y *Treponema*) o frecuentes en las muestras a estudiar (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Streptococcus*). Así mismo, se ensayó frente a ADN procedente de especies de *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Apodemus*, y ADN humano. Para evaluar la presencia de inhibidores, se diseñó un control interno con una secuencia no relacionada (*Cannabis sativa*, *thc*).

Resultados y conclusiones: El método fue capaz de detectar cualquier especie dentro de los géneros citados, incluso

especies no descritas, con una sensibilidad de entre 1 y 10 copias/equivalentes de genoma. La especificidad fue muy buena frente a ADN foráneo. Se presentan ejemplos de detección en muestras humanas, de vectores y de reservorios.

Financiación: RTIC EBATRAG (FIS G03/057); Protegido por Patente PCT/ES2006/070082

174

EVALUACIÓN DE LA PCR Y LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *PLASMODIUM* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA MALARIA IMPORTADA

E. Ruiz de Gopegui¹, A. Mena¹, M. Peñaranda², T. Serra¹, A. Morey¹ y J.L. Pérez¹

¹Servicio de Microbiología y ²Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca.

Objetivos: Determinar la utilidad de una técnica de PCR múltiple y de un método comercial de detección de antígeno de *Plasmodium* (AgPl) para el diagnóstico de la malaria.

Material y métodos: En el período 2005-07 se estudiaron un total de 232 muestras de sangre remitidas al laboratorio por sospecha de malaria. El diagnóstico se realizó por examen microscópico con Giemsa en todas ellas. En 161 ocasiones se llevó a cabo el AgPl (OptiMAL-IT[®]). En 177 ocasiones también se realizó una técnica de PCR múltiple (Rubio JM et al. J Clin Microbiol 1999; 37(10):3260-3264), tras extracción con columnas de QIAGEN[®], que era capaz de amplificar diferencialmente las cuatro especies del parásito junto con un control interno de proceso.

Resultados: Un total de 54 muestras procedían de pacientes con diagnóstico confirmado de malaria. De ellas, en 44 se realizaron las tres técnicas a la vez, y en 2 fueron todas negativas por obtenerse durante el tratamiento. De las restantes 42, la microscopía fue positiva en 36 [32 *Plasmodium falciparum* (Pf), 3 *Plasmodium vivax* (Pv) y 1 *Plasmodium ovale* (Po)]. La técnica AgPl fue positiva en 34 (30 Pf y 4 de especies distintas de Pf). La PCR detectó e identificó la especie en las 42 ocasiones. La sensibilidad fue 82%, 77% y 95%, por microscopía, AgPl y PCR, respectivamente. En otras 7 muestras, la PCR fue positiva de forma aislada (6 Pf, 1 Pv). Estas 7 muestras se obtuvieron de pacientes originarios de zona endémica con un cuadro febril. Asumiendo que eran verdaderos positivos, la sensibilidad corregida fue del 71%, 69% y 96%, respectivamente. La PCR también fue positiva en 12/14 muestras obtenidas de pacientes en tratamiento (1-7 días, mediana 2 d), mientras que la microscopía y el AgPl sólo fueron positivos en 5 muestras obtenidas con menos de 1 d de tratamiento. Hubo un falso positivo del AgPl (no se confirmó por otras técnicas), que detectó una especie distinta de Pf.

Conclusiones: a) La PCR mejora la sensibilidad, a la vez que permite realizar el diagnóstico de especie, aunque no es aplicable en situación de urgencia; b) la PCR permite realizar el diagnóstico incluso de pacientes con, al menos, 2 días de tratamiento; c) el método AgPl es inferior en sensibilidad a la microscopía; d) el AgPl OptiMAL[®] diferencia bien Pf de otras especies del parásito, aunque se detectó un falso positivo.

175

EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA INMUNOCROMATOGRÁFICA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- *TRYPANOSOMA CRUZI*

M. Flores¹, S. Gamen², M. Rodríguez¹, C. Monedero¹, T. Gárate¹ y C. Cañavate¹

¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ²Departamento de Biología Molecular, OPERON S.A., Zaragoza.

Introducción: La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es

endémica desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Sudamérica donde se transmite principalmente por vectores ródulos. En zonas no endémicas, el impacto de los flujos migratorios ha incidido en el aumento del número de casos descritos. Para el diagnóstico de las infecciones en fase crónica, etapa en la que se encuentran la mayoría de los afectados, la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* continúa siendo la principal herramienta de elección. Existen numerosas técnicas comerciales de diagnóstico serológico, la mayoría en formato de ELISA, IFI y HAI. Debido a la complejidad de la infección por *T. cruzi*, ninguna prueba es considerada "gold standard" y se recomienda la confirmación serológica mediante al menos dos pruebas de principios y antígenos distintos. No obstante, cuando el objetivo es realizar cribados serológicos rápidos se recomienda la elección de una prueba de alta sensibilidad (OMS, 2003).

Objetivos: Evaluar las propiedades diagnósticas de la prueba inmunocromatográfica "Stick Simple Chagas" mediante la utilización de paneles de sueros positivos, negativos, heterólogos, y en paralelo con sueros provenientes del Diagnóstico de Referencia realizado en el Servicio de Parasitología.

Material y métodos: Se utilizaron sueros de individuos positivos para la infección por *T. cruzi*, con leishmaniasis visceral, malaria y tripanosomiasis africana, procedentes de la Seroteca del Servicio de Parasitología, CNM, ISCIII. Paralelamente se evaluaron sueros provenientes de población inmigrante con sospecha clínica o epidemiológica de la infección, y candidatos a donantes de sangre. Las pruebas convencionales de detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* fueron ELISA e IFI "in house".

Resultados: Todos los sueros positivos del panel dieron una señal reactiva (15). Los sueros de pacientes con leishmaniasis (19) y con tripanosomiasis africana (3) fueron negativos. Se observó señal positiva en 6 de 25 pacientes con malaria activa. De un total de 373 muestras evaluadas en paralelo, 70 fueron positivas y de ellas 43 se confirmaron con los resultados de las pruebas IFI y ELISA. La sensibilidad de la prueba inmunocromatográfica "Stick Simple Chagas" fue del 100% y la especificidad del 92,4%.

Conclusión: La elevada sensibilidad de esta prueba sugiere que podría ser una herramienta útil para el cribado serológico rápido de la infección por *T. cruzi*.

176

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FILARIASIS: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA NESTED-PCR

T. Ta^{1,3}, R. López-Vélez² y J.M. Rubio³

¹Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

²Unidad de Medicina Tropical del Hospital Ramón y Cajal.

Madrid. ³Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

Introducción: La filariasis son un grupo de enfermedades producidas por nematodos de la familia *Filariae* y transmitidas por la picadura de insectos hematófagos. El método tradicional de diagnóstico es laborioso y poco sensible, requiriendo mucho volumen de muestra y de experiencia.

Objetivos: Desarrollar un método de diagnóstico molecular que nos permita diferenciar distintas especies de filarias y aumentar la sensibilidad respecto a los métodos parasitológicos convencionales.

Material y métodos: El aislamiento de ADN se realizó a partir de sangre completa en EDTA (mín. 200μl) con un kit comercial (QIAamp[®] DNA Mini Kit). Se diseñaron cuatro cebadores, dos externos (1^a PCR) y dos internos (2^a PCR), a partir del alineamiento y análisis de diferentes secuencias de filarias y grupos afines de la subunidad pequeña del ADN ribosómico, del gen 5,8 y de los espaciadores internos, obtenidas del banco de secuencias GenBank/EMBL con el paquete informático Bioedit 7.1. y con el programa Clustal V. Los fragmentos amplificados se visualizan con luz UV en gel de agarosa al 2% (p/v) teñidos con Bromuro de Etidio, se purifican y se secuencian pa-

ra una correcta identificación y descartar productos amplificados no específicos o contaminantes.

Resultados: Los primeros diseñados son específicos de filarias y no amplifican fragmentos humanos, y permiten identificar la especie de filaria según tamaño del amplicón. No se han obtenido amplificación en muestras negativas y en positivas sólo han mostrado homología con filarias y no con genoma humano. Los tamaños obtenidos se corresponden con los esperados tanto en geles de agarosa (nivel macro) como por secuenciación (nivel fino). Los tamaños de los productos de PCR obtenidos son: 773 p.b. y 739 p.b. para *O. volvulus* y *M. perstans* respectivamente (1^a PCR) y 482 p.b. y 449 p.b. para *O. volvulus* y *M. perstans* respectivamente (2^a PCR). La secuenciación de *Loa loa* se encuentra en proceso.

Discusión: Para estudios epidemiológicos y poblacionales, es tan importante un correcto diagnóstico como el de disponer de un método de detección que no sólo sea sencillo sino también sensible y específico. En infecciones mixtas o en donde coexisten varias especies de filarias, el diagnóstico parasitológico no es adecuado para una correcta identificación, tratamiento y control por su limitada sensibilidad. Se ha observado una ligera variación en la secuencia genética de las filarias dependiendo del origen de las cepas.

Conclusiones: La Nested-PCR puede ser una importante herramienta en el diagnóstico diferencial de filarias en situaciones tales como co-endemicidad o en co-infecciones. Es una técnica sencilla capaz de detectar y diferenciar diferentes filarias.

177

UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE PCR A TIEMPO REAL Y β (1-3)-D-GLUCANO EN LA CANDIDIASIS INVASIVA

C. Castro¹, M. Ramírez¹, A. I. Aller², V. Rubio²,

M. T. Ruiz³, J. C. Palomares², J. Aznar³ y E. Martín Mazuelos¹

¹Hospital Universitario Valme, Sevilla. ²Hospital SAS Jerez, Cádiz. ³Hospital Universitario V. del Rocío, Sevilla.

Objetivo: Estudiar la utilidad de la PCR a tiempo real y el β (1-3)-D-Glucano en un estudio prospectivo con pacientes neutropénicos ingresados en el H. S.A.S de Jerez, H. Universitario V. del Rocío y en el H. Universitario Valme.

Pacientes y métodos: Estudiamos 130 pacientes que presentaban factores predisponentes para desarrollar una infección fúngica invasiva (IFI) durante el período de tiempo comprendido entre septiembre del 2004 y julio del 2006. A todos ellos se les tomaron dos muestras de suero semanales, junto a otras muestras, según criterio clínico (hemocultivos, esp. bronquiales, BAL, ...). El cultivo de las muestras se realizó por técnicas convencionales en el laboratorio de Microbiología. La técnica de PCR a tiempo real, Light Cycler[®] (Roche System Diagnostics, Germany), se realizó a 2 sueros semanales (un total de 941 sueros), realizándose una extracción previa de la muestra con líticasa (Sigma[®], Madrid, España) y el método comercial QIAmp Tissue Kit β (QIAgen, Barcelona, España). Los casos con alta sospecha clínica o aquellos que presentaron PCR positiva seriadas en el tiempo (22 sueros) fueron remitidos a un laboratorio especializado para realizar la detección del β (1-3)-D-Glucano, Fungitell[®] (Associates of Cape Cod. Incorporated, Falmouth, MA).

Resultados: Del total de 941 sueros estudiados (130 pacientes), obtuvimos un total de 9 sueros (0,96%) positivos por la técnica de PCR, pertenecientes a 4 pacientes del estudio. De los 22 sueros (6 pacientes) que fueron enviados para realizarse la determinación del β (1-3)-D-Glucano 15 sueros (68,6%) fueron positivos, pertenecientes a los 6 pacientes estudiados. Cuando analizamos ambos parámetros conjuntamente observamos que todos los casos que presentaron PCR positiva también presentaban en el suero β (1-3)-D-Glucano circulante, anticipándose 4 días a la PCR en dos de los cuatro casos, apareciendo positiva la PCR y el β (1-3)-D-Glucano simultáneos en el tiempo en los otros dos casos. Los pacientes estudiados habían recibido previamente trasplante alógénico de médula ósea.

Conclusiones: 1. Todos los pacientes que presentaban alta sospecha de IFI, o bien PCR positivas presentaron β (1-3)-D-Glucano circulante, anticipando 4 días el diagnóstico microbiológico. 2. Posiblemente el bajo número de casos de candidiasis invasiva puede deberse a la profilaxis antifúngica a la que están sometidos estos pacientes. 3. Más estudios son necesarios para poder evaluar el valor predictivo en este tipo de pacientes.

178

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR) PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE *COCCIDIOIDES IMMITIS*

M.J. Buitrago, A. Gómez-López, J.L. Rodríguez-Tudela y M. Cuenca-Estrella
S. Micología. CNM. Inst. Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

Introducción: *C. immitis* es un hongo dimórfico endémico en zonas secas del continente americano. En los últimos años se han descrito algunos casos de coccidioidomicosis (CM) en Europa asociados a viajes a zonas endémicas. Aunque esta enfermedad es muy poco frecuente en nuestro país, la inmigración y los viajes hacen suponer que la incidencia de esta micosis aumentará en los próximos años. *C. immitis*, además, es un microorganismo que puede usarse como arma bioterrorista, dadas sus elevadas virulencia y capacidad de diseminación.

Objetivo: Valoración de la técnica cuantitativa de PCR-TR para la detección de ADN de *C. immitis*.

Material y métodos: Las reacciones de PCR-TR se llevaron a cabo en el equipo LightCycler 2.0 (Roche, Madrid, España). Se diseñaron dos sondas FRET específicas y dos primers con el programa LC probe Desing Report (Roche), dirigidos a un fragmento de 190 pb del la zona ITS-1 (Internal Transcriber Spacers) del ADN ribosómico. Para la puesta a punto in vitro, se obtuvo ADN de cepas de colección de 4 cepas de *C. immitis*, y se usaron cepas y secuencias de otras 270 especies fúngicas para el estudio de especificidad. La manipulación de los cultivos y la extracción de ADN se realizó en un laboratorio de biosseguridad para manejo de patógenos del grupo 3. También se incluyó ADN humano y de ratón como controles negativos.

Resultados: La cuantificación del ADN fúngico fue reproducible, con coeficientes de variación inferiores al 10%. El límite de detección de la PCR-TR se situó entre 1-10 fg de ADN por μ L de muestra de las cuatro cepas analizadas. La especificidad fue absoluta, ya que no se detectó ADN de ninguna de las otras especies fúngicas.

Conclusiones: 1) Esta técnica de PCR-TR es un método reproducible, sensible y específico para la detección de ADN de *C. immitis*. 2) Es necesario probar esta técnica con un mayor número de cepas y con muestras procedentes de pacientes. 3) Esta técnica se encuentra disponible en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología y se ofrece a todos los centros del Sistema Nacional de Salud, para ser utilizada en casos sospechosos de CM.