

Material y métodos: De Noviembre del 2005 a Julio de 2006 se procesaron 131 muestras respiratorias correspondientes a 131 niños menores de tres años (20 exudados nasofaringeos, 16 aspirados nasofaringeos, 13 exudados nasales, 3 exudados faríngeos y 1 aspirado nasal), con diagnóstico clínico de infección respiratoria. Todas las muestras fueron procesadas mediante técnicas de cultivo rápido ("shell-vial") y convencional en distintas líneas celulares (MDCK, LL-MK2, Hep2 y RD) según protocolos establecidos. En la mayoría de ellas se realizó PCR previa extracción mediante el sistema automático COBAS Ampliprep (Roche Diagnostics). Se llevaron a cabo dos RT-PCR-nested múltiples, la primera para detección de Virus Influenza A, B y C (IA, IB, IC), Virus Respiratorio Sincitial A y B (VRS) y Adenovirus (ADV). La segunda para la detección de Virus Parainfluenza 1-2-3-4 (VPI), Coronavirus respiratorios no SARS (HCoV229E-OC43), Rhinovirus (VRH) y Enterovirus respiratorios (EV) siguiendo los protocolos del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). Se consideró un resultado como positivo cuando lo fue por cualquiera de las técnicas utilizadas. Cuando se detectó Citomegalovirus (CMV) mediante cultivo convencional, su presencia se confirmó mediante PCR.

Resultados: Se detectó la presencia de virus en las muestras respiratorias de 53 pacientes (40,4% del total). De ellos, se encontró un solo virus en 44 (44/53, 83,1%): 10/44 (22,7%) VRS (A o B), 8/44 (18,1%) IB, 7/44 (17,5%) ADV, 5/44 (11,3%) EV, 4/44 (9%) VPI, 4/44 (9,1%) HCoV229E- OC43, 3/44 (6,8%) IA, 2/44 (4,5%) CMV y 1/44 (2,2%) IC. En 9 pacientes (9/53, 16,9%) se detectó infección mixta: 2 VPI/ CO229-43, 2 VPI/ADV, y 1 VPI/VRS, 1 IA/IB, 1 ADV/IB, 1 ADV/VRS, 1 ADV/EV

Conclusiones: 1. La presencia de virus en las muestras respiratorias de la población pediátrica estudiada (niños menores de 3 años con clínica de infección respiratoria) fue del 40%. 2. Las infecciones mixtas supusieron un 17% de las muestras positivas. 3. Se ha detectado por PCR la presencia de Coronavirus (HCoV229E-OC43) en el 11,3% de las muestras estudiadas, pero ningún VRH.

180

BOCAVIRUS EN INFECCIONES RESPIRATORIAS DE VÍAS BAJAS EN NIÑOS MENORES DE 3 AÑOS

D. Vicente, M. Montes, G. Cilla, E. Oñate¹, E. Pérez-Yarza¹ y E. Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología y Departamento de Pediatría¹, Hospital Donostia, San Sebastián.

Introducción. Bocavirus humano es un virus de la familia Parvoviridae descubierto en el año 2005. Los escasos estudios realizados hasta el momento muestran que Bocavirus tiene una distribución mundial, asociándose fundamentalmente a infección respiratoria aguda (IRA) alta y baja en niños.

Objetivo: Estudiar la presencia de bocavirus en niños con IRA en Gipuzkoa, las características clínicas y epidemiológicas de los episodios en los que este virus es detectado y analizar genéticamente las cepas circulantes en nuestra región.

Método: En el período octubre 2004-octubre de 2006 se estudiaron 537 episodios de IRA de vías bajas (IRAVB) que afectaron a niños menores de 3 años, bien en forma de neumonía (criterio diagnóstico OMS) o con IRABV no neumónica (bronquiolitis o bronquitis). Se realizó cultivo celular (shell vial) y PCR para detección de virus respiratorios (influenza, parainfluenza, adenovirus, VRS, metapneumovirus, coronavirus, rhinovirus). Bocavirus se detectó mediante PCR amplificando un fragmento del gen NP1. Los resultados positivos se confirmaron mediante una segunda PCR (gen VP1) y secuenciación de ambos amplicones.

Resultados: Entre los 537 episodios estudiados (339 neumonías) se detectó bocavirus en 60 (11,2%). Sólo 18 casos afectaron a niños menores de 1 año (uno menor de 3 meses).

Sesión 12: Infecciones víricas (no VIH) (2)

179

INCIDENCIA DE VIRUS EN NIÑOS MENORES DE TRES AÑOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA

J. Torres¹, I. López¹, S. Perez¹, T. González del Blanco², M.M. Portugués³, F. Ulloa¹, E. Martínez¹ y F.J. Vasallo¹
¹Microbiología, ²H. do Meixoeiro. C.H.U.V.I. ³Microbiología.

³S. Pediatría. H. Xeral-Cies. C.H.U.V.I.

Objetivos: Conocer la incidencia de virus que causan infecciones respiratorias en niños menores de 3 años en el área sur de la provincia de Pontevedra.

Bocavirus cuando afectó al tracto respiratorio inferior se asoció mayoritariamente con neumonía (48/339, 14,2%). Su detección en niños con bronquitis o bronquiolitis fue significativamente menor (12/198, 6,1%) ($p = 0,004$). Bocavirus fue el único virus detectado en 19 (31,6%) ocasiones y en 41 (68,4%) la infección fue mixta (19 VRS, 6 rhinovirus, 5 influenza, 2 parainfluenza, 2 metapneumovirus, 1 coronavirus y 6 con dos virus respiratorios). Todas las cepas detectadas mostraron una similitud genética > 95% con las circulantes en otros lugares del mundo.

Conclusiones. Bocavirus es un virus frecuentemente detectado en niños con IRAVB especialmente en aquellos que cursan con neumonía. Afecta a niños de edad superior a los que afectan otros virus respiratorios como VRS. Las cepas detectadas en Gipuzkoa presentaron escasa diversidad genética. El conocimiento de la epidemiología y clínica de este patógeno emergente es todavía muy limitado.

181

COINFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE Y DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL EN PACIENTES CON SÍNDROME GRIPAL

M. Alonso¹, A. Galar¹, V. Martínez de Artola², J. Castilla³, M. Fernández Alonso¹, Red de Médicos Centinela para la vigilancia de la gripe en Navarra

¹Servicio de Microbiología. Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona. ²Hospital Virgen del Camino. Pamplona. ³Instituto de Salud Pública del Gobierno de Navarra. Pamplona.

Objetivo: Determinar la frecuencia de coinfección por los distintos virus gripales y el virus sincitial respiratorio (VSR) en pacientes con diagnóstico de síndrome gripal en la temporada 2005-2006.

Métodos: La red de médicos centinela de atención primaria de Navarra para la vigilancia de la gripe cubre una población de 31.999 habitantes. Notifica todos los casos de síndrome gripal diagnosticados en esta población y recoge frotis nasofaríngeo de aproximadamente un 10% de los pacientes. Se considera síndrome gripal a la presencia de 6 de las siguientes manifestaciones: comienzo súbito, fiebre, escalofríos, tos, malestar general, artromialgia y síntomas respiratorios de vías altas. En fase de epidemia de gripe se considera suficiente la presencia de 4 síntomas. En las 76 muestras recogidas en la temporada 2005-2006 se realizó aislamiento de virus de la gripe por cultivo celular, y determinación por PCR de virus de la gripe y VSR. El presente análisis se limita a los 65 frotis recogidos durante las semanas con actividad gripal.

Resultados: De los 65 frotis tomados durante las semanas con actividad gripal 42 (65%) resultaron positivos para gripe: 27 (42%) para gripe A y 15 (23%) para gripe B. El diagnóstico de gripe se obtuvo en el 80% de los menores de 5 años, frente a los 52% de los mayores de 14 años. La PCR para el VSR dio positiva en 18 casos (28%), oscilando entre el 10% en menores de 5 años y 32% en mayores de 14 años. El 21% de los pacientes que dieron positivo para la gripe también dieron positivo para el VSR. No se detectó VSR hasta tres semanas después del inicio de la actividad gripal. Entre los que dieron positivo para la gripe A, la coinfección por VSR afectó al 33% mientras que ninguno de los diagnosticados con gripe B presentó coinfección por VSR ($p = 0,042$). De todos los síndromes gripales analizados, el 14% presentaron coinfección por gripe y VSR. En los pacientes con síndrome gripal que habían recibido la vacuna antigripal de esa temporada la detección de virus gripal (1/5, 20%) fue menos frecuente que en los no vacunados (48/60, 68%; $p = 0,021$). Sin embargo la vacunación antigripal no modificó la frecuencia de detección de VSR en la PCR (40% y 27%; $p = 0,611$).

Conclusión: El VSR de forma aislada o en coinfección con el virus de la gripe aparece frecuentemente como causa de síndrome gripal, especialmente a partir de 5 años de edad. Encuentramos mayor frecuencia de coinfección del VSR con la gripe A que con la B. La detección del VSR se observa independientemente del estado de vacunación antigripal, lo que podría explicar algunos casos de síndrome gripal en personas vacunadas.

drome gripal, especialmente a partir de 5 años de edad. Encuentramos mayor frecuencia de coinfección del VSR con la gripe A que con la B. La detección del VSR se observa independientemente del estado de vacunación antigripal, lo que podría explicar algunos casos de síndrome gripal en personas vacunadas.

182

ETIOLOGÍA VÍRICA DE LA BRONQUIOLITIS EN DIFERENTES ÁREAS DEL SERVICIO DE PEDIATRÍA DEL HOSPITAL MATERNAL E INFANTIL DE BADAJOZ

M. Fajardo, M.T. Muñoz-Lozano, E. Garduño, R. Sánchez-Silos, P. Martín-Cordero y J. Blanco

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz.

Introducción y objetivos: Las infecciones virales representan el 90% de la patología infecciosa del niño, siendo las más frecuentes de origen respiratorio. La bronquiolitis es una afección del tracto respiratorio inferior causada por numerosos virus durante el período invernal. Conocer la etiología vírica de las bronquiolitis, producidas durante el período de Octubre de 2005 hasta Marzo de 2006, en niños que requirieron ingreso en el Hospital.

Material y métodos: Detectar mediante inmunocromatografía, en muestras nasofaríngeas de niños con clínica de bronquiolitis, la presencia de antígenos de los Virus Respiratorio Sincitial (VRS), Influenza A y B, y Adenovirus respiratorio serotipos 2, 3, 5 y 7, en las distintas Áreas del Servicio de Pediatría.

Resultados: En 115 (59%) de las 195 muestras estudiadas se encontró un resultado positivo para algún tipo de virus. El número de muestras positivas y porcentaje para VRS, Influenza A, Influenza B y Adenovirus fue de 89 (78%), 19 (17%), 3 (2%) y 4 (3%) respectivamente. En 11 casos existió una coinfección entre VRS e Influenza A, y en dos casos fueron entre Influenza A más B. Lactantes y Urgencias fueron las Áreas con más muestras positivas, 50 y 36 respectivamente, seguidas de Prematuros con 16. Por meses, Enero y Febrero fueron los meses cuando más identificaciones se realizaron, 76% del total.

Conclusiones: El VRS es la primera causa de bronquiolitis en la edad pediátrica, seguido de Influenza A. Influenza B y Adenovirus son microorganismos poco frecuentes en nuestra población. Si bien el número de coinfecciones no es muy elevado, se deberían testar todos los virus en cada paciente para realizar un correcto mapa epidemiológico.

183

ETIOLOGÍA VIRAL DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS DE VIAS BAJAS EN PACIENTES INGRESADOS

I. López-Isidro¹, C. Sarriá¹, J.L. Navarro², J.M. Azcona², N. Monclús², L. Cardeñoso² y C. Casal²

Servicios de Medicina Interna-Infecciosas¹ y Microbiología². Hospital Universitario de la Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Objetivos: Determinar la frecuencia del aislamiento de virus respiratorios en los pacientes que ingresan en el hospital por infección respiratoria de vías bajas o que la desarrollan durante su hospitalización. Relación entre el aislamiento viral y las características epidemiológicas, clínicas, radiológicas, de laboratorio y microbiológicas de la infección respiratoria.

Material y métodos: Estudio descriptivo, prospectivo en pacientes que entre el 1 de enero al 30 abril de 2006, ambos inclusive, ingresaron en el Servicio de Medicina Interna-Infecciosas a consecuencia de una infección respiratoria de vías bajas o que en el transcurso del mismo la desarro-

llaron. Se excluyeron los pacientes con neumonía por aspiración. Se incluyeron 80 pacientes de los que se obtuvieron datos epidemiológicos, clínicos, radiológicos, resultados analíticos y microbiológicos. En 4 la infección era nosocomial, 10 procedían de una residencia y el resto de la comunidad. Se tomaron muestras respiratorias (lavado nasofaríngeo o secreciones nasofaríngeas mediante hisopo) para detección de virus respiratorios mediante técnicas de detección rápida: virus influenza, parainfluenza, respiratorio sincitial (VRS) y adenovirus. 6 pacientes se trasladaron a otro centro y en 12 se dio al alta un diagnóstico alternativo por lo que solo se realizó el análisis en 62. Se compararon los datos recopilados en los pacientes con técnica rápida positiva y negativa.

Resultados: En 10 pacientes las técnicas de diagnóstico rápido resultaron positivas: 6 parainfluenza, 2 influenza A y 2 VRS. 2 eran diabéticos y el resto inmunocompetentes. Los diagnósticos fueron: 4 neumonías segmentarias, 4 bronquitis agudas, 1 EPOC reagudizado y 1 gripe. En ninguno de los ítems estudiados se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con técnica rápida positivas y negativas, excepto una tendencia a que el broncoespasmo sea más frecuente en las infecciones virales ($p = 0,052$). Un paciente con técnica rápida positiva falleció.

Conclusiones: 1. Los virus respiratorios pueden producir enfermedad severa que conlleve el ingreso hospitalario. 2. Los virus parainfluenza fueron los más comunes.

184

ESTUDIO DE LA INCIDENCIA Y LOS FACTORES CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VIRUS RESPIRATORIOS EN VIAJEROS PROCEDENTES DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

M. Camps¹, A. Vilella², M.A. Marcos¹, E. Letang², J. Muñoz², E. Salvadó², J. Gascón², M.T. Jiménez de Anta¹ y T. Pumarola¹

¹Servei de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Hospital Clínic de Barcelona ²Centre de Salut Internacional, Hospital Clínic de Barcelona.

La investigación de las infecciones en viajeros ha estado clásicamente centrada en infecciones como la malaria, el dengue, la diarrea del viajero y otras enfermedades que se pueden prevenir con una adecuada profilaxis y vacunación previaje. Aún así, en un porcentaje importante de síndromes febriles no se alcanza un diagnóstico etiológico.

Objetivo: Estudiar la incidencia de infección por virus respiratorios en viajeros procedentes de zonas tropicales y subtropicales atendidos en la consulta de Medicina Tropical del Centro de Salud del Hospital Clínic e identificar las variables clínicas y epidemiológicas asociadas a la misma.

Materiales y métodos: Entre Agosto del 2005 y Septiembre del 2006 se incluyeron aquellos pacientes mayores de 14 años procedentes de zonas tropicales o subtropicales con un síndrome febril durante el viaje, en los 10 días previos o en los 10 días posteriores a su llegada. Para el estudio de virus respiratorios, a cada paciente se le recogió un frotis nasal y faríngeo. Las técnicas realizadas fueron: Inmunofluorescencia indirecta para los virus de la gripe A (VGA) y B (VGB), virus parainfluenza 1-3 (VPI1-3), adenovirus (ADV) y virus respiratorio sincitial (VRS); dos RT-PCR multiplex por un lado para los virus VGA, VGB, VGC, ADV, VRSA, VRSB y ADV; por el otro para VPI1-4, coronavirus229E (CoV229E), coronavirusOC43 (CoVOC43), enterovirus (EV) y rinovirus (RV). Retrospectivamente se realizó una RT-PCR para la detección del metapneumovirus humano. En aquellas muestras que resultaron positivas para VGA se realizó un subtipado de la hemaglutinina (H) para H1, H3 y H5 con una RT-PCR específica y se inocularon en la línea celular MDCK

para su aislamiento. En función de la clínica de cada paciente y bajo criterio médico también se realizaron otras determinaciones microbiológicas.

Resultados: Durante el período de estudio se incluyeron 118 viajeros con síndrome febril, 61 hombres (52%) y 57 mujeres (48%) con una media de edad de 37 años. Más de la mitad de los pacientes habían viajado al continente asiático (53%), seguido de África (36%) y América Latina (11%). En el 56% de los casos se alcanzó un diagnóstico etiológico. En un 53% de estos se detectó un virus respiratorio, otros microorganismos en un 32% y en un 15% una coinfección de un virus respiratorio y otro patógeno. Los VGA/B representaron el 38% de los virus respiratorios detectados, seguidos de los RV (28%), ADV (9%), VRS (9%) y con menor frecuencia VPI, coronavirus y EV.

Conclusiones: Los virus respiratorios son una causa importante de síndrome febril en viajeros procedentes de zonas tropicales y subtropicales. Es necesario plantear la necesidad de vacunación pre viaje frente a los virus de la gripe.

185

DETECCIÓN DE BOCAVIRUS HUMANO EN NIÑOS

L. Villa, A. Morilla, E. Gómez, J. Rodríguez¹, J.A. Boga, S. Melón y M. de Oña

Servicios de Microbiología (Unidad de Virología) y Pediatría¹ del Hospital Universitario Central de Asturias.

Introducción: El bocavirus humano (HBoV), es un nuevo miembro de la familia Parvoviridae asociado con infección del tracto respiratorio.

Objetivo: Estudio prospectivo para evaluar la importancia del HBoV en infecciones respiratorias de niños y definir sus características clínicas.

Material y métodos: Desde el 20 de abril al 26 de noviembre del 2006, se recogieron 366 muestras (209 exudados faríngeos, 148 nasales, 5 nasofaríngeos, 2 aspirados bronquiales y 2 lavados broncoalveolares) de 339 niños (190 niños y 149 niñas) con edad media de $2,91 \pm 3,36$ años (3 días-13 años) y con los siguientes diagnósticos: 118 (34,8%) con síntomas de infección del tracto respiratorio inferior (bronquiolitis, neumonía, traqueitis), 115 (33,9%) del tracto superior (tos, faringitis, rinitis), 74 niños (21,8%) con fiebre y 32 (9,4%) con síntomas inespecíficos. Las muestras se procesaron para detección de antígeno por IF (IA, IB, VRS, Adenovirus, Parainfluenza -PIV- 1, 2, 3 y Metapneumovirus -hMPV), cultivos rápido y convencional (líneas MDCK, LLC-MK2 y MRC-T) y detección genómica. La extracción genómica se realizó automáticamente (COBAS/Ampliprep, Roche). Se llevó a cabo una RT-PCR múltiple para IA/IB/IC/VSRA/VSRA, (protocolo ISCHII), otra para el hMPV/Coronavirus, otra para PIV 1/3 y a 106 exudados faríngeos de niños con faringitis exudativa una PCR para EBV. La detección de HBoV se realizó mediante PCR "nested" utilizando cebadores diseñados en nuestro laboratorio. Varias cepas de BoH se secuenciaron (Applied Biosystem).

Resultados: Se detectó algún virus en 161 (43,98%) muestras, pertenecientes a 151 (44,54%) niños. El VRS se encontró en 56 (16,52%), Adenovirus en 25 (7,37%), PIV en 25 (7,37%), hMPV en 14 (4,13%) y Enterovirus en 13 (3,83%). VHS-1, CMV, IA y Coronavirus aparecieron esporádicamente. El EBV se detectó en 9 (8,49%) de las 106 muestras estudiadas. El HBoV se detectó en 26 (7,67%) niños, con una edad media de $1,14 \pm 1,0$ años (8 días-5 años), principalmente entre 6 y 12 meses ($n = 9$) y en infecciones del tracto respiratorio inferior. Se asoció en 10 ocasiones a infecciones mixtas (38,46% de todos los HBoV). Su incidencia mensual no superó el 10%, salvo en julio (18,2%) y en septiembre (26,1%).

Conclusiones: El BoVH es frecuente en las infecciones del tracto respiratorio inferior de niños pequeños. BoVH se asocia con otros virus respiratorios. No presentó picos de estacionalidad.

186**BOCAVIRUS HUMANO EN INFECCIONES INTESTINALES**

D. Vicente, M. Montes, G. Cilla, M. Gomariz, E. Pérez-Yarza¹ y E. Pérez-Trallero

Servicio de Microbiología y Departamento de Pediatría¹, Hospital Donostia, San Sebastián.

Introducción: Bocavirus humano es un virus de la familia Parvoviridae descubierto en 2005¹ y sólo asociado a infecciones respiratorias agudas (IRA) hasta su reciente descubrimiento como posible agente gastroenterítico en niños menores de 3 años (Vicente D et al, *Emerg Infect Dis*, en prensa). En este estudio se ha investigado la presencia de bocavirus en heces de niños menores de 15 años con gastroenteritis aguda (GEA).

Método: Entre Diciembre de 2005 y Abril de 2006 se han estudiado 709 episodios de GEA comunitaria. La detección de bocavirus se realizó con una PCR que amplifica un fragmento del gen NP1, confirmando los resultados positivos mediante amplificación del gen VP1 y posterior secuenciación de sus amplícones. Para el estudio de coinfección en cada muestra se investigaron un total de 9 enteropatógenos (3 virus y 6 bacterias).

Resultados: Entre los 709 episodios investigados, bocavirus se detectó en 50 (7,1%). La detección máxima se produjo en Diciembre (11,8% de las GEA investigadas) disminuyendo progresivamente hasta Abril (1,8%). Bocavirus fue solo ocasionalmente detectado en niños de 3 ó más años de edad (1,1%) pero fue frecuente en menores de 2 años (39/411, 9,5%). No se detectó ningún caso en niños < 3 meses de edad (0/34). No hubo diferencias por sexos. En 28 casos se detectó coinfección con otro enteropatógeno. Las cepas detectadas presentaron una similitud genética mayor del 95%.

Conclusiones: 1) Bocavirus es excretado en heces más frecuentemente en los meses fríos. 2) Bocavirus se detectó sobre todo en niños entre 3 y 23 meses de edad, siendo infrecuente en niños mayores de 3 años. 3) Como en las infecciones respiratorias, las coinfecciones fueron frecuentes.

¹Allander T, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 12891-6.

187**GASTROENTERITIS AGUDA POR NOROVIRUS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS INGRESADOS EN UN HOSPITAL DE MADRID**

R. Mohedano, S. Quevedo, S. Rey, R. Jimenez, M. del Alamo, A. Revilla*, A. Sanchez-Fauquier* e I. Wilhelmi
Servicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa, Leganés (Madrid). *Sección de Virus productores de gastroenteritis. CNM, Majadahonda, Madrid.

Introducción: Los Norovirus (NV) son una de las principales causas de gastroenteritis aguda (GEA) esporádica y epidémica. El desarrollo de métodos diagnósticos ha permitido que este virus sea reconocido como causa de GEA en todos los grupos de edad. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la frecuencia de GEA por NV en niños menores de 5 años ingresados en nuestro hospital y describir las características clínicas que muestran estos pacientes.

Métodos: Durante el año 2005 se estudiaron prospectivamente los pacientes menores de 5 años que presentaron GEA como motivo de ingreso o durante la hospitalización. En las muestras de heces se realizó detección de rotavirus, adenovirus, astrovirus y bacterias enteropatógenas. La detección de NV se realizó mediante ELISA (IDEIA® NVL, OXOID) y RT-PCR específica. Para la descripción clínica se incluyeron los casos del año 2005 y 45 del período octubre-2001 a abril-2004. En 42 muestras se determinó el genotipo del virus mediante secuenciación genética.

Resultados: Se detectó NV en 29 (14,8%; I.C.95%: de 9,6 a 20,0) de los 196 niños estudiados que ingresaron con GEA durante el año 2005. En 20 casos (68,96%) se constató infección mixta y aunque no se detectó una clara estacionalidad, la mayoría de los casos se registraron en otoño. Las características de los 74 pacientes con GEA por NV de los 2 períodos estudiados fueron: Edad media de 14,0 meses, mediana 11,5, amplitud intercuartil (AIC) de 8. El 50% fueron varones. El origen fue nosocomial en 10 pacientes (13,5%). Presentaron diarrea un 95,9% con una duración media de 4 días (mediana 3, AIC de 3 días); vómitos 66 pacientes (88,0%) con una media de 2,3 días de duración (mediana 2,0, AIC de 2 días) y fiebre 29 (39,2%) pacientes. La estancia media hospitalaria fue de 3,8 días (mediana de 3, AIC de 2,3 días). En 12 niños se objetivó deshidratación moderada-grave, en 24 leve y 15 casos con acidosis metabólica. Se instauró tratamiento parenteral en 59 (78,7%) pacientes. El NV genotipo II, genotipo Lorsdale fue el predominante.

Conclusiones: Los NV fueron una causa frecuente de GEA (14,8%) en los niños ingresados de nuestra serie, constituyendo la segunda causa después de rotavirus que fue responsable del 55,1% de los casos. Dada la importancia de este virus, probablemente infravalorado, se hace necesario su inclusión en los sistemas de vigilancia de gastroenteritis vírica para precisar su importancia y características.

188**VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS GASTROENTERITIS POR ROTAVIRUS (PROYECTO VIGESS-NET): APARICIÓN DE GENOTIPOS VIRALES EMERGENTES**

J. Colomina¹, F. Gimeno-Villarrasa¹, M. Vaya¹, S. Llanes¹, A. Guerrero¹, I. Wilhelmi¹, V. Montero³, A. Sánchez-Fauquier³ y miembros restantes de Vigess-Net

¹Servicios de Microbiología y Pediatría, Hospital de La Ribera, Alzira-Valencia. ²Servicio de Microbiología, Hospital Severo Ochoa, Leganés-Madrid. ³Sección de Gastroenteritis Virales, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda-Madrid.

Introducción y objetivos: Vigess-Net (www.rotaviruses.blogspot.com) es un proyecto de investigación prospectivo sobre las gastroenteritis infecciosas en niños que requieren ingreso hospitalario, en el que participan actualmente 26 hospitales pertenecientes a 14 Comunidades Autónomas (CCAA) de España. Entre sus objetivos principales destacan el conocer la incidencia anual de hospitalizaciones por rotavirus y su contribución al total de casos de gastroenteritis que precisan hospitalización, y el de estimar la distribución de los genotipos de rotavirus circulantes en las diferentes CCAA y en España.

Material y métodos: Con el fin de alcanzar dichos objetivos, cada uno de los hospitales participantes recoge una muestra de heces y rellena una encuesta clínico-epidemiológica para cada caso detectado. Se considera "caso" a los niños menores de 5 años que ingresan por un cuadro de gastroenteritis aguda. Los especímenes fecales son centralizados y analizados en el Centro Nacional de Microbiología mediante técnicas de inmunoanálisis y de biología molecular.

Resultados: Durante la temporada 2005-06, se analizaron un total de 656 muestras. Rotavirus fue detectado en 379 muestras (59%), pero también estuvo presente en 40 casos de coinfección con otros virus. Otros agentes infecciosos detectados fueron: norovirus (12%), bacterias enteropatógenas (5%), astrovirus (3%) y adenovirus 40/41 (2%). En las muestras rotavirus positivas, el genotipo predominante fue el G9 (44%), seguido de G3 (29%); los típicos genotipos universalmente predominantes, G1 y G4, solo fueron detectados en un 20% y 1%, respectivamente, de los casos. Los resultados preliminares de la temporada 2006-07, muestran que el genotipo predominante de rotavirus sigue siendo el G9 (74%), seguido del G1 (11%).

Conclusiones: Rotavirus es y sigue siendo una causa frecuente de ingreso hospitalario por lo que las nuevas vacunas preventivas pueden depararnos un futuro esperanzador. Los rotavirus G9 se consolidan como el genotipo predominante en España en los últimos años. Los resultados de Vigess-Net serán de gran relevancia para estimar la verdadera eficacia de las vacunas anti-rotavirus que están a punto de implantarse.

189

DIAGNÓSTICO Y SECUENCIACIÓN DE FLAVIVIRUS

M. de Oña¹, M.C. Galarraga², S. Pérez³, A. Rodríguez¹, M. Rodríguez¹, J.A. Boga¹ y S. Melón¹

Servicios de Microbiología del ¹Hospital Universitario Central de Asturias, ²Hospital San Agustín de Avilés y ³Hospital Meixoeiro.

La infección por el virus del Dengue es la arbovirosis más frecuente del mundo. En los últimos años el dengue, junto con la malaria, constituye una de las más comunes enfermedades importadas a través de viajeros.

Objetivo: Poner a punto en nuestro laboratorio la técnica de PCR para Flavivirus y la secuenciación de las muestras positivas para genotipar los serotipos de Dengue.

Pacientes: Se estudiaron 15 muestras (plasma o suero) pertenecientes a 9 pacientes: 4 presentaban una sospecha clínica y epidemiológica de padecer la infección y 5 pacientes que habían viajado a países endémicos y durante su estancia tuvieron episodios de fiebre.

Métodos: El genoma viral fue extraído usando un sistema de purificación automática de ácidos nucleicos (Ampliprep Roche). La detección se llevó a cabo mediante amplificación genómica usando una RT-PCR anidada y cebadores dirigidos contra la región codificadora de la glicoproteína M (protocolo ISCIII). El producto de amplificación de 143 pb fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa. Los amplicones fueron extraídos del gel y secuenciados utilizando el cebador interno antisentido (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem) en un secuenciador automático "ABI Prism 3100".

Resultados: En 4 pacientes fue positiva la PCR, dos de ellos se pudieron tipar por secuenciación siendo en un caso un VDÉN 1 y otro VDÉN 4. Todos tuvieron fiebre de 5-7 días de evolución después de regresar de países endémicos para Dengue (Colombia, Brasil y Caribe). Las manifestaciones clínicas más frecuentemente observadas fueron además de la fiebre (4/4), alteraciones gastrointestinales (4/4), alteración de pruebas hepáticas (4/4), trombocitopenia (3/4), artralgias (3/4), leucopenia (2/4), exantema cutáneo (1/4) y dolor retroocular (1/4). Todos los casos evolucionaron favorablemente.

Conclusiones: 1) La PCR de Flavivirus es una técnica específica, rápida y útil para el diagnóstico diferencial del síndrome febril de pacientes procedentes de países endémicos. 2) Las muestras de suero son muestras adecuadas para este diagnóstico. 3) La presentación más común fue fiebre, alteraciones gastrointestinales y de pruebas de función hepática. 4) La secuenciación con el cebador interno antisentido utilizados en la PCR permitió diferenciar clara y específicamente los serotipos detectados.

190

DETECCIÓN DE METAPNEUMOVIRUS (HMPV) POR PCR EN TIEMPO-REAL EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA Y ADULTA QUE REQUIERE ATENCIÓN HOSPITALARIA

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

Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

Introducción: En el año 2001 se describía el hMPV, un virus respiratorio de la familia *Paramyxoviridae*. Nos plantea-

mos como objetivo conocer y comparar la incidencia de hMPV en población pediátrica y adulta, comparando la incidencia y la distribución estacional de hMPV con la de otros virus respiratorios.

Material y métodos: Se analizaron 210 muestras respiratorias de pacientes pediátricos y 210 de adultos con infección respiratoria que requirieron atención hospitalaria durante el año 2004. Se realizó cultivo convencional y shell-vial en las líneas celulares A-549, MRC-5 y MDCK y se investigó mediante inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales la presencia de virus Influenza A y B, Virus respiratorio sincitial (VRS) y Parainfluenza 1, 2 y 3 y Adenovirus (ADV) (Monofluo® Screen, Bio-Rad). Mediante RT-PCR en tiempo real se detectó la presencia de hMPV por amplificación del gen N. El ARN se obtuvo a partir de 140 µl de muestra respiratoria empleando el sistema de extracción QIAamp viral RNA kit (Qiagen). Tras la RT la PCR en tiempo real se realizó en el LightCycler Instrument versión 2,0 (Roche Molecular Biochemicals) con los parámetros de amplificación: 10 min a 95°C, y 50 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. El producto de PCR se detectó mediante una sonda TaqMan.

Resultados: De las 420 muestras analizadas se detectó alguno de los virus estudiados en 95 (22,62%), correspondiendo 76 (80%) a pacientes pediátricos y 19 (20%) a pacientes adultos. Los virus detectados en las muestras pertenecientes a niños fueron: 38 VRS (50%), 10 hMPV (13,15%), 9 ADV (11,84%), 9 Parainfluenza 3 (11,84%), 5 ETV (6,57%), 3 PCV (3,94%) y 2 Influenza A (2,63%). En tres casos se detectó coinfección. En las muestras de pacientes adultos los virus detectados fueron: 6 Influenza A (31,57%), 6 Parainfluenza 3 (31,57%), 3 VRS (15,78%), 1 hMPV (5,26%), 1 ADV (5,26%), 1 PCV (5,26%) y 1 Influenza B (5,26%). Las infecciones por hMPV representaron el 11,57% de las infecciones respiratorias diagnosticadas y los casos se distribuyeron de Enero a Abril, con picos de máxima incidencia en febrero y abril.

Conclusiones: El hMPV supone un importante agente de infección respiratoria en población pediátrica, que en nuestros sujetos supuso el segundo agente causal más frecuente después de VRS, con porcentajes de incidencia del orden de las infecciones por Adenovirus y Parainfluenza 3. Sin embargo, la incidencia de hMPV en adultos resultó ser mucho menor. Los períodos de máxima incidencia de hMPV fueron febrero y abril.

191

DETECCIÓN DE CORONAVIRUS 229E, OC43 Y NL63 POR PCR EN TIEMPO-REAL EN PACIENTES ADULTOS INMUNOSUPRIMIDOS

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

Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

Introducción: A la familia de los Coronavirus humanos (HCoV), clásicamente formados por los HCoV-229E y OC43, se han incorporado recientemente dos nuevos agentes, NL63 y KU1. El objetivo de este estudio fue determinar la incidencia y distribución estacional del HCoV-NL63 en comparación con los HCoV clásicos 229E y OC43 en pacientes adultos inmunosuprimidos (pacientes con procesos hematológicos malignos y receptores de trasplante de órgano sólido).

Material y métodos: Se analizaron 540 muestras respiratorias de pacientes adultos inmunosuprimidos con infección respiratoria que requirieron atención hospitalaria entre el 1 de Enero de 2004 y el 31 de Julio de 2006. Se realizó cultivo convencional y shell-vial en las líneas celulares A-549, MRC-5 y MDCK y se investigó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales la presencia de virus Influenza A y B, Virus respiratorio sincitial y Parainfluenza 1, 2 y 3 y Adenovirus (Monofluo® Screen, Bio-Rad). Mediante RT-PCR en tiempo real se detectó la presencia de hMPV, HCoV 229E, OC43 y NL63. El ARN se obtuvo a partir de 140 µl de muestra respiratoria empleando el sistema de extracción QIAamp

viral RNA kit (Qiagen). Tras la RT la PCR en tiempo-real se realizó en el LightCycler Instrument versión 2.0 (Roche) con los parámetros de amplificación común: 10 min a 95°C, y 50 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. El producto de PCR se detectó mediante sondas TaqMan.

Resultados: De las 540 muestras a estudio se detectó algún HCoV en 14 de ellas (2,59%). HCoV-229E fue el más frecuentemente detectado ($n = 7$; 50%), seguido de HCoV-NL63 ($n = 4$; 28.58%) y de HCoV-OC43 ($n = 3$; 21,42%). En 4 casos se detectó coinfección de HCoV y otro virus respiratorio. La enfermedad hematológica maligna fue la patología de base más frecuente. De los 14 casos de infección por HCoV, 7 se produjeron en el 2004, 3 en el 2005 y 4 en el 2006. Los casos de HCoV-229E se distribuyeron estacionalmente entre marzo y julio, los de HCoV-OC43 entre febrero y abril y los de HCoV-NL63 entre diciembre y febrero.

Conclusiones: La incidencia de HCoV en nuestro grupo de pacientes fue muy baja, siendo el HCoV-229E el más prevalente, seguido de NL63 y OC43 respectivamente. La incidencia varió anualmente y la distribución estacional fue diferente según el tipo de HCoV. Debido a la dificultad de crecimiento de HCoV en las líneas celulares habitualmente empleadas, la PCR en tiempo-real constituye una importante herramienta de diagnóstico en estas infecciones.

192

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG E IGM FRENTE AL VHE MEDIANTE DOS TÉCNICAS SEROLÓGICAS: EIA E IB

A. Fernández-Olmos, M. Rodríguez-Domínguez, O. Martín S. de la Maza, M. Mateos y F. Baquero

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

Introducción: La hepatitis aguda E (HE) es una infección producida por el virus de la hepatitis E (VHE) endémica en regiones subdesarrolladas. Últimamente se han descrito casos esporádicos autóctonos en varios países de Europa occidental entre ellos España. El diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos IgG e IgM frente al VHE por un método inmunoenzimático (EIA) en pacientes con sintomatología compatible con hepatitis vírica. Recientemente se ha comercializado una prueba de inmunoblot (IB) que detecta anticuerpos IgG e IgM dirigidos contra antígenos de la cápside y de la ORF 3 del genoma del VHE.

Objetivo: Comparar las dos técnicas disponibles comercialmente, EIA e IB, para la detección de antiVHE en el diagnóstico de HE.

Material y método: Se han estudiado prospectivamente 40 muestras de suero pertenecientes a 40 pacientes con sospecha de HE. Las muestras procedían en su mayoría de los Servicios de Gastroenterología (46%), Enfermedades Infecciosas (23%) y Urgencias (21%). La detección de IgG e IgM antiVHE se realizó mediante EIA (Bioelisa HEV IgG y Bioelisa HEV IgM, Biokit SA, Barcelona) e IB (recomBlot HEV IgG/IgM, Mikrogen GmbH Martinsried, RFA). Los resultados se han dividido en tres categorías, positivo (P), dudoso (D) y negativo (N). En el caso del IB, los criterios vienen definidos por el fabricante. En la prueba de EIA, se ha considerado el índice de absorbancia (muestra/valor límite): N < 1, D 1-2 y P > 2.

Resultados: Analizados los resultados del EIA e IB de antiVHE se encontró una moderada concordancia para IgG antiVHE ($K = 0,51$), mientras que para IgM resultó una concordancia discreta ($K = 0,29$). Entre los resultados no concordantes, 5 pacientes discrepaban tanto en la IgG como en IgM antiVHE, cuyos diagnósticos son: 2 hepatitis autoinmunes, 1 hepatitis B crónica, 1 sífilis y 1 hepatitis aguda sin filiar.

Conclusiones: Aunque el número de muestras no es muy elevado debido a la baja prevalencia de la HE en España, podemos afirmar que existe una discreta-moderada concordancia entre los dos métodos, según los valores de Kappa obtenidos.

Creemos que la sintomatología clínica tiene una gran relevancia para el diagnóstico aunque hay que tener en cuenta que la HE puede cursar de manera asintomática y en estos casos es necesario apoyarse en los resultados de detección de antiVHE proporcionados por el laboratorio. Un aspecto importante es establecer una prueba como gold estándar para el diagnóstico de HE con la que comparar ambas técnicas.

193

PREVALENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO EN RELACIÓN CON DISTINTOS GRADOS DE LESIÓN CITOLOGICA

M. Trigo, P. Álvarez, M. Hernández, M. Pascual, V. Pulian, M. García

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario de Pontevedra.

Objetivos: La causa principal de cáncer de cérvix es la infección persistente por tipos específicos de virus del papiloma humano (VPH) conocidos como genotipos de alto riesgo (VPH-AR). El objetivo de este estudio es correlacionar los distintos grados de lesión citológica con la presencia de VPH-AR.

Métodos: Se estudiaron 198 muestras cervicales con distintos grados de lesión. Las muestras fueron amplificadas con una mezcla de primers consenso de genotipos de alto riesgo mediante PCR. Posteriormente los amplificados se detectaron por hibridación con sondas específicas usando Amplicor HPV Test® (Roche Diagnostics).

Resultados: El 5,5% (11/198) de las muestras presentaron lesiones de alto grado (H-SIL), el 30,8% (61/198) presentaron lesiones de bajo riesgo (L-SIL), 21,7% (43/198) presentaron células escamosas de significado incierto (ASCUS), el 20,2% (40/198) eran seguimientos postconización y finalmente el 21,7% (43/198) no mostraban alteraciones citológicas. Se detectaron VPH-AR en 69 muestras (34,8%). Las prevalencia de VPH-AR se correlacionó directamente con la gravedad de la lesión citológica del siguiente modo: 100% de las H-SIL (11), el 54,5% de las L-SIL (33), el 23,3% de las ASCUS (10), y el 11,6% de las muestras normales fueron positivas para VPH-AR. Mientras que en los seguimientos postconización el 25% (10) de las muestras mostraron una infección residual o recurrente. En cuanto a correlación del VPH-AR con la edad, hay diferencias significativas ($p = 0,0073$) 54,3% (25/46) en < 30 años y 30,9% (44/142) en el grupo de ≥ 30 años.

Conclusiones: Existe una relación directa entre la gravedad de la lesión citológica y la presencia de VPH-AR, llegando en éste a detectarse en el 100% de las muestras con lesiones de alto grado. La prevalencia de VPH-AR muestra un patrón con la edad reflejo de los hábitos sexuales poblacionales y de la historia natural de la infección del virus, siendo más frecuente la presencia de VPH-AR en edades en las que la conducta sexual es más activa y la infección transitoria (54,3% en < 30 años frente a 30,9%). El diagnóstico de VPH-AR es esencial en la orientación de la conducta ginecológica a seguir, especialmente en los casos de ASCUS en los que la presencia de HP-AR se confirma en menos del 30% de los casos estudiados.

194

DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DE VIRUS PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO EN MUESTRAS CERVICALES EN UNA POBLACIÓN SELECCIONADA

M. Trigo, P. Álvarez, M. Hernández, M. Pascual, V. Pulian y M. García

Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario de Pontevedra.

Objetivos: El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de los distintos genotipos de VPH-AR en mujeres VPH-AR positivas que acuden a consulta del Servicio de Ginecología.

Métodos: En el estudio se incluyeron 117 mujeres con distintos grados de lesión citológica positivas para DNA de VPH-AR, determinado previamente mediante PCR y el genotipo fue determinado con Linear Array®HPV Test (Roche Diagnostics).

Resultados: El 75,21% (88/117) de las muestras presentaron un solo tipo de VPH-AR, detectándose en el 16,23%, 3,4% y 2,5% infecciones dobles, triples y cuádruples respectivamente. En mujeres menores de 30 años la infección múltiple fue del 27,2% (15/55), mientras que en mayores de 30 años fue del 20% (14/67). Si tenemos en cuenta el tipo de lesión citológica, la infección múltiple es más frecuente en lesiones de alto grado (H-SIL) 41% (7/17) que en lesiones de bajo grado (L-SIL) 25,8% (15/58) o lesiones escamosas de significado incierto (ASCUS) con el 14% (2/14). La prevalencia de los genotipos de AR fue la siguiente: 16 (30,3%), 51 (9,6%), 45 (8,3%), 31,18 y 56 (7,1%), 58 y 59 (5,8%), 68, 52, 39 y 35 (< 5%). El genotipo 16 se detectó con mayor frecuencia en mujeres < 30 años (34,8%) que en mujeres mayores de esta edad (27,2%). Este genotipo es más prevalente en muestras con citología H-SIL 42% (11/26), que en muestras L-SIL 28,7% (23/80), al igual que lo que ocurre con el genotipo 45 con 11,5% (3/26) y 2,5% (2/80) de prevalencia respectivamente. No se detectó ningún genotipo 18 en el grupo de H-SIL.

Conclusiones: La infección múltiple es más frecuente en menores de 30 años en correspondencia con la mayor promiscuidad de este grupo de edad, y es más prevalente cuanto más grave es la lesión citológica. El genotipo 16 es el genotipo aislado con mayor frecuencia tanto en monoinfecciones como en infecciones múltiples, en todos los grupos de edad y lesiones citológicas. Parece existir una relación entre el grado de lesión citológica y la presencia de este genotipo, siendo más frecuente en lesiones H-SIL que en L-SIL. Es llamativo que aunque se estima que el 70% de los cánceres de cérvix están causados por los genotipos 16 y 18, no hemos detectado ningún genotipo 18 en el grupo con H-SIL.