

cir la incidencia de reacción de hipersensibilidad a Abacavir. Hasta este momento, se ha informado que la prevalencia de este alelo en población mediterránea es del 1-2%, pero la prevalencia en población española infectada por VIH no se ha determinado. Este dato es importante a la hora de establecer análisis de coste-efectividad en futuras estrategias.

**Material y métodos:** Estudio de prevalencia. Se incluyeron pacientes adultos infectados por VIH (independientemente de su historia de tratamiento), en seguimiento en 74 centros de toda España. El número de pacientes a reclutar y su distribución por centros fueron representativos de la población española infectada por VIH. Después de la aprobación del estudio por los CEICs, cada paciente dio su consentimiento por escrito para participar en el estudio y se recogieron datos demográficos y de etnia. La determinación del HLA-B\*5701 fue realizada tanto por laboratorios locales (hospital) como por un laboratorio central utilizando las siguientes técnicas: Serología para tipado de baja resolución (B\*57), y tanto PCR-SSOP o PCR-SSP para tipado de alta resolución (B\*5701). Para las determinaciones realizadas en el laboratorio central (Lab Corp) se utilizó PCR-SSOP.

**Resultados:** Se determinó el HLA-B\*5701 en 1190 pacientes infectados por VIH. La mediana de edad fue de 43 años y un 73% eran mujeres. De acuerdo a los datos sobre sus antecesores un 92,2% (IC 95% 90,7-93,7) fueron clasificados como Caucásicos, 5,9% (IC 95% 4,4-7,0, n = 68) Amerindios y 1,4% (IC 95% 0,7-2,1, n = 17) Africanos/Afro-Americanos. De los datos del laboratorio central, la prevalencia global del HLA-B\*5701 fue del 6,0% (IC 95% 4,7-7,5); y su distribución por etnias:

Etnotipo	Prevalencia (%)	IC 95%
Caucásico (n = 1097)	6,4	5-7,8
Amerindios (n = 68)	1,5	0,03-7,9
Africanos/Afro-Americanos (n = 17)	0	NA
Otros (n = 8)	0	NA

La prevalencia en mujeres fue del 5,9% (IC 95% 3,3-8,5). La concordancia (vs resultados del lab. Local) fue del 99,2% (IC 95% 98,4-99,6).

**Conclusiones:** Este estudio aporta un cuadro bastante ajustado de la prevalencia del alelo HLA-B\*5701 en la población española infectada por el VIH así como en los grupos étnicos más relevantes. La prevalencia del alelo HLA-B\*5701 en pacientes españoles infectados por el VIH (6%) es mayor que la previamente publicada para los países mediterráneos.

## Métodos moleculares de diagnóstico

### 403

#### PREVALENCIA DEL HLA-B\*5701 EN PACIENTES ESPAÑOLES INFECTADOS POR VIH

J. Arrizabalaga<sup>1</sup>, J.L. Castañer<sup>2</sup>, A. Ocampo<sup>3</sup>, D. Podzamczer<sup>4</sup>, F. Pulido<sup>5</sup>, M. Riera<sup>6</sup>, J. Sanz<sup>7</sup>, M. Pascual-Bernaldez<sup>8</sup>, F. Rodríguez-Alcántara<sup>8</sup> y R. Dal-Re<sup>8</sup> en nombre del grupo de estudio EPI 109839

<sup>1</sup>Servicio Enf. Infecciosas, H. Donostia (San Sebastián). <sup>2</sup>Servicio Inmunología, H. Ramón y Cajal (Madrid). <sup>3</sup>Servicio Medicina Interna-VIH, H. Xeral de Vigo. <sup>4</sup>Servicio Enf. Infecciosas, H. Bellvitge (Barcelona). <sup>5</sup>Unidad VIH, H. Doce de Octubre (Madrid). <sup>6</sup>Unidad Enf. Infecciosas, H. Son Dureta (P. Mallorca).

<sup>7</sup>Servicio Enf. Infecciosas, H. La Princesa (Madrid).

<sup>8</sup>Departamento Médico, GlaxoSmithKline (Tres Cantos).

**Introducción:** El estudio PREDICT-1 ha establecido la utilidad clínica de la determinación del HLA-B\*5701 en redu-

#### ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE ABBOTT REALTIME HIV-1 Y VERSANT 440 MOLECULAR SYSTEM PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL PLASMÁTICA EN PACIENTES INFECTADOS POR DIFERENTES SUBTIPOS DE VIH-1 GRUPO M

G. Ayala<sup>1</sup>, J.M. González-Alba<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Domínguez<sup>1</sup>, M. Lobo<sup>1</sup>, S. Moreno<sup>2</sup>, F. Baquero<sup>1</sup> y J.C. Galán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología Clínica, <sup>2</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España.

**Objetivo:** Realizar un estudio comparativo de la determinación de carga viral (CV) de VIH entre el recientemente aprobado ensayo de PCR en tiempo real(qPCR), Abbott RealTime™HIV-1 (Abbott Molecular) y la última versión de la tecnología bDNA, Versant™440 Molecular System (Siemens).

**Material y métodos:** Se establecieron inicialmente 2 grupos: A) incluía pacientes que portaban VIH-1 subtipo B (mayoritario en nuestro entorno) y B) pacientes que portaban VIH-1 que no perteneciera al subtipo B (determinado según reconstrucciones filogenéticas basadas en distancia). En ca-

da grupo se definieron 6 intervalos en función de los valores de CV: < 50 copias (c)/mL; 50-499 c/mL; 500-4999 c/mL; 5000-49999c/mL; 50.000-499.999c/mL; > = 500.000 c/mL. Para cada intervalo de cada grupo se eligieron un mínimo de 6 muestras según la técnica de cuantificación bDNA hasta un total de 79 muestras de 67 pacientes. El procesamiento de las muestras previo a la detección y cuantificación del virus fue manual.

**Resultados:** Aplicando el análisis estadístico Bland-Altman, con un intervalo de confianza del 95%, la diferencia media entre ambos procedimientos fue de 0,314. El coeficiente de correlación entre ambas técnicas en las muestras pertenecientes al grupo A (subtipo B) fue de 0,961, mientras que en el grupo B (subtipos no-B), el coeficiente de correlación fue 0,973, si bien dentro de este grupo en un caso (subtipo G) se observó una discrepancia > 1 log entre ambos procedimientos. Abbott RealTime™HIV-1 rindió valores más altos de CV, especialmente dentro del grupo no-B. Esta característica se hace más evidente cerca de los límites de cuantificación de ambas técnicas. Así, el 27% de las muestras pertenecientes al grupo A y el 83% de las muestras pertenecientes al grupo B, con valores indetectables de CV utilizando Versant™440 Molecular System, pudieron ser cuantificadas utilizando Abbott RealTime™HIV-1. Por otra parte, en el 3,4% de las muestras procesadas por qPCR no se pudo cuantificar la CV debido a problemas de inhibición de la polimerasa.

**Conclusiones:** Globalmente la correlación entre ambos métodos, bDNA y qPCR, fue excelente. En su conjunto, Abbott RealTime™HIV-1 determinó valores de CV de VIH más altos que Versant™440 Molecular System, especialmente con algunos subtipos no-B, lo que podría plantear algunos problemas futuros. Los casos de inhibición detectados con qPCR revelan que esta técnica requiere una muy buena calidad del RNA, mientras que bDNA resultó ser una técnica más robusta.

## 405

### EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DETECCIÓN Y GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) BASADA EN ARRAYS, EN RELACIÓN CON LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES DE CRIBAJE DEL CÁNCER CERVICAL

N. García<sup>1</sup>, E. Martró<sup>1,2</sup>, E. Castellà<sup>3</sup>, M. Llatjós<sup>3</sup>, A. Tarrats<sup>4</sup>, L. Matas<sup>1,2</sup> y V. Ausina<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología (Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. <sup>2</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona.

<sup>3</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. <sup>4</sup>Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.

**Introducción:** El cáncer cervical es el segundo cáncer más prevalente en mujeres en todo el mundo. La infección por el VPH, especialmente por tipos de alto riesgo (AR), es causa necesaria para el desarrollo de este cáncer. Actualmente el cribaje poblacional por citología (Papanicolaou) suele complementarse con la detección del genoma del VPH. El objetivo del estudio fue comparar los resultados de una técnica de detección y genotipado del PVH (PCR e hibridación en arrays [PCR-A]), con la técnica de captura del híbrido (CH) en relación con la citología y describir los tipos de VPH presentes.

**Material y métodos:** Se recogió una muestra de citología líquida (Thin-Prep®) en un grupo de mujeres seleccionadas (citología alterada o DNA-PVH positivo previo). A todas las muestras se les realizó citología (clasificación de Bethesda) y CH; las positivas por alguna de las dos técnicas y aquellas con volumen insuficiente fueron evaluadas por la técnica de PCR-A (N = 302). La técnica de CH (Híbrid Capture®II Test™High-Risk HPV DNA, Digene) basada en la amplificación de señal detecta 13 tipos de AR. La técnica de PCR-A (CLINICAL ARRAYS®-Papillomavirus, Genomica) basada en la amplificación genética detecta 35 tipos por hibridación

en arrays; 5 de AR, 3 de probable AR, 6 de riesgo indeterminado y 12 de bajo riesgo (BR).

**Resultados:** Las pacientes tenían una edad de 15-72 años (media, 38). La concordancia entre las dos técnicas fue moderada en la detección de tipos de AR (N = 261, κ = 0,58). De 154 muestras HC positivas sólo 106 (68,8%) se confirmaron como AR por PCR-A; del resto, 32 eran tipos de BR o probable AR y 16 negativas. De las muestras ASCUS sólo el 23,1% fueron positivas para DNA-PVH por las dos técnicas. Entre las pacientes positivas por PCR-A el 47,3% presentaban infección por ≥ 2 tipos, y el 68,1% infección por tipos de AR, mayoritariamente el 16 (22,9%). En mujeres VIH-positivas (35,1%) se hallaron dos tipos de BR en infección simple asociados a HSIL. Según la prevalencia observada de los tipos incluidos en la vacuna (6, 11, 16 y 18) y debido a la presencia de un 40,1% de infecciones múltiples (algunas de ellas con otros tipos de AR) la administración de la vacuna hubiera protegido como mínimo al 45,5% de las mujeres con HSIL estudiadas en nuestro centro.

**Conclusiones:** En nuestro hospital el cribaje por HC y citología junto con la confirmación y genotipado por PCR-A permite una óptima identificación de las mujeres a riesgo de padecer cáncer cervical, así como determinar la posible contribución de la vacuna tetravalente en nuestro medio.

## 406

### EVALUACIÓN CLÍNICA DE UNA MULTIPLEX FLUORESCENTE PCR (F-HVP TYPING) PARA LA DETECCIÓN Y GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

M. de la Paz Cañadas<sup>1</sup>, V. Cirigliano<sup>1</sup>, M. Ejárque<sup>1</sup>, E. Ordoñez<sup>1</sup> y G. Voglino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biología Molecular, <sup>1</sup>General Lab, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Promea Lab, Torino, Italy.

**Objetivo:** La mayoría de las infecciones por VPH dan lugar a lesiones de bajo grado que luego regresan espontáneamente. Sin embargo, entre un 3%-10% de mujeres no superan la infección y se convierten en mujeres persistentes para esta infección, constituyendo un grupo de alto riesgo para la progresión a lesiones cervicales. Por esta razón, es esencial una detección rápida de la infección para el diagnóstico de lesiones precancerosas cervicales y su tratamiento. El conocimiento del genotipo específico de VPH que está infectando constituye una herramienta muy importante por su significado pronóstico y terapéutico.

El objetivo es evaluar clínicamente un nuevo método de PCR para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano en muestras clínicas.

**Material y métodos:** Muestras procedentes de 3058 mujeres; (102 ASCUS, 1499 LSIL, 162 HSIL y 145 cánceres cervicales fueron analizadas mediante PCR multiplex fluorescente, un nuevo ensayo de PCR comercializado recientemente. El kit F-HVP typing™ amplifica los tipos VPH-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y otra secuencia humana utilizada como control interno, añadida para garantizar la integridad del ADN.

**Resultados:** Fueron detectados VPH de alto riesgo oncogénico en el 42% de los ASCUS, en el 51 % de los LSILs, en el 90 % de los HSILs y en el 99% de los cánceres cervicales. Los cuatro tipos más frecuentes fueron VPH-16, VPH-31, VPH-58 y VPH-56, aumentando la frecuencia del VPH-16 a medida que incrementaba la lesión. La prevalencia de la infección por edad fue superior en las mujeres más jóvenes, decreciendo a medida que aumentaba la edad, mientras que la lesión aumentaba con la edad.

**Conclusión:** Nuestros resultados confirman que el VPH-18 no es uno de los tipos más frecuentes, dato de gran importancia por la futura instauración de la vacuna. Por otro lado, el conocimiento de las frecuencias y distribución genotípica puede ser una herramienta muy útil para disponer de datos epidemiológicos antes de la implantación de la vacunación,

con el fin de evaluar los posibles cambios en las prevalencias que puedan derivarse como consecuencia de la vacunación. Los resultados obtenidos muestran que el ensayo F-HVP typing™ es altamente sensible detectando tipos específicos de alto riesgo oncovígeno simultáneamente en una múltiple PCR, permitiendo a su vez la detección de infecciones múltiples en un único ensayo.

## 407

### APLICACIÓN DE UN EXTRACTOR AUTOMÁTICO DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA MEJORAR LA DETECCIÓN DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

L. Piñeiro, J.M. Marimón, D. Vicente, E. Serrano y G. Cilla  
S. de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa.

**Introducción/Objetivos:** El uso de los métodos moleculares ha aumentado la sensibilidad del diagnóstico de la infección por *Chlamydia trachomatis* (CT). Uno de los métodos comerciales más utilizados en nuestro país es el COBAS TaqMan (Roche), que incluye un equipo de preparación manual de la muestra mediante lisis para obtener los ácidos nucleicos. El objetivo de este trabajo fue comparar este procedimiento manual con una extracción automatizada de ácidos nucleicos.

**Material y métodos:** Entre diciembre 2007 y enero 2008 se analizaron prospectivamente 100 muestras (49 de cervix, 39 uretrales, 9 rectales y 3 de otras localizaciones) de pacientes con sospecha de infección por CT empleando dos métodos de obtención de ácidos nucleicos: *a*) preparación (lisis) manual con el kit Amplicor CT/NG Specimen Preparation, Roche y *b*) método automatizado con el kit NucliSens en el robot Easy-MAG, BioMérieux. La detección de CT se efectuó mediante la PCR comercial COBAS TaqMan CT Test (Roche), basada en la amplificación del plásmido críptico y que incluye un control interno de amplificación. La valoración de los resultados se realizó con el analizador COBAS TaqMan 48, Roche.

**Resultados:** De las 100 muestras estudiadas se detectó CT en 14 procesadas con el método de preparación manual y en 20 procesadas con el método de extracción automatizada. Todas las muestras que fueron positivas con el método manual lo fueron también con el automático. Seis muestras (3 de cervix, 2 rectales y una uretral) fueron positivas cuando la extracción de ADN se hizo con el método automático y negativas cuando se efectuó la preparación manual. Esta diferencia estadísticamente significativa con el test de McNemar para datos pareados ( $z = 2,45$ ;  $p = 0,007$ ).

El análisis semicuantitativo de la carga bacteriana, realizado por medio de los ciclos de amplificación, sugirió la detección de un mayor número de copias de CT a partir del sistema de extracción automática respecto del manual. Asimismo, este análisis mostró que en las muestras con resultado discrepante, el ciclo en el que se detectó la amplificación fue más alto, sugiriendo que la carga bacteriana presente en estas muestras era más baja.

**Conclusión:** Este estudio preliminar sugiere que un sistema de extracción automatizada de ácidos nucleicos puede mejorar el rendimiento de la técnica manual empleada actualmente.

## 408

### CONFIRMACIÓN Y TIPADO DE VPH MEDIANTE MICROARRAYS (CLINICAL ARRAYS PAPILLOMAVIRUS®)

M. Domínguez-Gil, R. Ortiz De Lejarazu, J.M. Eiros, A. Tenorio y A. Curiel

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

**Introducción:** El inconveniente principal en el diagnóstico del Virus del Papiloma Humano (VPH) mediante la captura de híbridos (Hybrid Capture II, Digene) es que no permite

distinguir entre los diferentes tipos virales ni la presencia de infecciones múltiples.

Los microarrays genéticos suponen un nuevo abordaje para la caracterización mediante técnicas de hibridación de productos de PCR. En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas basados en dicha tecnología, algunos de ellos disponibles en el mercado como Clinical Arrays Papillomavirus (Genomica SAU, España).

**Objetivos:** Comparar los resultados al analizar las muestras de cérvix uterino por ambos tipos de técnicas y determinar el tipo de VPH más frecuente en nuestro medio.

**Material y métodos:** Se analizaron los resultados obtenidos en 377 muestras de cérvix uterino por HC-II y los obtenidos por Microarrays.

En las muestras en las que se detectó ADN de VPH mediante Microarrays se procedió a determinar el tipo de VPH. Se estudiaron los tipos de VPH que se detectaban con mayor frecuencia al emplear esta técnica de detección y tipado. También se analizaron las coinfeciones por más de un tipo de VPH que se detectaron por Microarrays.

**Resultados:** De las 377 muestras procesadas por ambas técnicas, 203 (53,5%) fueron positivas por HC-II y 188 (49,9%) lo fueron por Microarrays, frente a las 174 muestras negativas (46,2%) por HC-II y 189 (50,1%) muestras negativas por microarrays sensibilidad de 90,3% ( $IC_{95\%}$ : 85,8-94,8) de los Microarrays, y 92,9% ( $IC_{95\%}$ : 88,7-97,1) de especificidad. El VPP fue de 93,3% y el VPN del 89,7%. Un 46,8% fueron infecciones por un único tipo de VPH, mientras que el 53,2% fueron coinfecções. Los tipos más frecuentes fueron: VPH 16 (31,8%); VPH 6 (14,7%); VPH 53 (13,6%); VPH 58 (8,0%) y VPH 70 (4,5%). Las coinfecções detectadas en el mismo período de tiempo estudiado mediante Microarrays fueron 100 (53,2%), la mayor parte de las mismas eran por dos tipos de VPH: 84 (84,0%), por tres tipos de VPH: 12 (12,0%), por cuatro: 2 (2,0%) y más de cuatro tipos de VPH en 2 (2,0%).

**Conclusiones:** La técnica de los microarrays muestra unos buenos valores de sensibilidad y especificidad. Es muy frecuente la presencia de coinfecções por distintos tipos de VPH. En nuestro medio el VPH 16 es el más frecuente, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, seguido de los tipos 6 y 53.

## 409

### EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS REP-PCR Y RFLP-PCR, PARA LA TIPIFICACIÓN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

V.G. Galan<sup>1</sup>, M.J. Torres<sup>2</sup> y J. Aznar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>S. de Microbiología, HH.UU. Virgen del Rocío. <sup>2</sup>S. de Parasitología Clínica. Dpto. Microbiología, Universidad de Sevilla.

**Objetivos:** Evaluar las técnicas REP-PCR y RFLP-PCR para la tipificación de aislamientos clínicos de *Campylobacter jejuni*.

**Material y métodos:** Las cepas de este estudio fueron aisladas en niños menores de 5 años que acudieron al Servicio de Urgencias Pediátricas, con un cuadro de gastroenteritis aguda (GEA) y que requirieron ingreso, desde Abril 2006 a Mayo de 2007. Para el estudio de la GEA se requirieron muestras de heces. A todas estas se les realizó un coprocultivo mediante siembra en: medio de agar sangre, agar McConkey, agar Salmonella-Shigella (SS), y caldo Selenito (37/24h) y medio Skirrow modificado (48h en atmósfera microaerófila. 42%/5% CO<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Campygen® OXOID). La identificación de *C. jejuni*, se realizó mediante la expresión de la hidrólisis de hipurato. Las cepas se conservaron congeladas a -70°C hasta su tipificación. Se tomaron 1-3 colonias representativas del cultivo para la extracción de AND siguiendo las normas del fabricante (KIT EXTRACCIÓN DNA SSS. REAL) Para la técnica REP-PCR se utilizó el cebador OPA-11 (5'-CAA TCG CCG T- 3') Hernández et al., 1995. Para la técnica RFLP-PCR se amplificó un fragmento de 9.6 kb del cluster del gen del lipopolisacárido (LPS) de la membrana. Se utilizaron los cebadores galE (-GCGGTGGTGCAGGTTA-

ATAGG-) y wlaH3 (TCAGTTCTGCCATTAAATTTCT) <sup>Feng S 2002</sup>, 10 µl del producto de PCR fue digerido con 10 U de enzima de restricción: Hha I, Dde I y Hind III. Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Para el análisis de los patrones de electroforesis, se empleó el programa informático BioNumeric versión 4.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)

**Resultados:** Se diagnosticaron 2.375 niños del área hospitalaria de GEA. 530 (22,3%) acudieron al Servicio de Urgencias. Tras la 1º consulta y valoración de la clínica, 411 (17,3%) niños permanecieron hospitalizados. Se obtuvieron 41 aislamientos de *C. jejuni*; 32 de estas cepas fueron estudiadas. Empleando la técnica REP-PCR, estas se agruparon en 20 patrones diferentes. Con la técnica RFLP-PCR se agruparon en función de las diferentes enzimas utilizadas: HhaI: las cepas se agruparon en 16 patrones diferentes. DdeI: 22 patrones. HindIII: 8 patrones.

**Conclusiones:** Debido al escaso nº de bandas de los patrones, se considera que la REP-PCR no es una buena técnica de tipificación, siendo la técnica RFLP-PCR de mayor utilidad para la tipificación de *C. jejuni*. La enzima con mayor poder de resolución es Dde I.

## 410

### COMPARACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B: COBAS AMPLIPREP-COBAS TAQMAM HBV VS VERSANT HBV 3.0

G. Reina<sup>1</sup>, A. Galar<sup>1</sup>, M. Rubio<sup>1</sup>, M.E. Portillo<sup>1</sup>, M. Iñigo<sup>1</sup>, A. Pérez-García<sup>1</sup>, J.I. Riezu-Boj<sup>2</sup>, M. Fernández-Alonso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Clínica Universitaria de Navarra.

<sup>2</sup>Terapia Génica y Hepatología. CIMA, Universidad de Navarra.

**Introducción:** El virus de la hepatitis B (VHB) es la principal causa de enfermedad hepática crónica en el mundo. La mejor manera de detectar la replicación viral es mediante la cuantificación del genoma de VHB en plasma del paciente. Existen diferentes métodos comerciales para la determinación de la carga viral de VHB.

**Objetivo:** Comparar la cuantificación realizada con un método de PCR en tiempo real (COBAS Taqman HBV test, Roche Diagnostics) y un método de amplificación de la señal (VERSANT HBV 3.0, Bayer Diagnostics).

**Material y métodos:** Se realizaron 74 cargas virales consecutivas de VHB entre los meses de marzo y julio de 2007. Se recogieron muestras de plasma y suero de cada paciente, realizándose la carga viral por COBAS Taqman y VERSANT HBV, respectivamente. Las muestras fueron conservadas a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

**Resultados:** Se obtuvieron 59 resultados concordantes entre ambas técnicas y 15 discrepancias (20,3%). Entre las discrepancias, hubo 14 muestras positivas por COBAS Taqman y negativas en VERSANT HBV, debido a la mayor sensibilidad de la técnica de PCR (12UI/mL) frente a la técnica de amplificación de la señal (357UI/mL). De estos 14 pacientes, 13 estaban diagnosticados de hepatitis B crónica y eran AgHBs(+), 9 de estos 13 sujetos estaban recibiendo tratamiento antiviral. El caso restante procedía de un paciente que presentó AgHBs(+) 3 meses después, por lo que podía tratarse de una detección precoz de la infección. Una única muestra fue negativa mediante COBAS Taqman y positiva en VERSANT HBV, siendo este paciente AgHBs negativo y sin signos de hepatitis. Se realizó una comparación entre las 2 técnicas con las 38 muestras cuyos valores de carga viral estaban dentro del rango dinámico de ambas. El coeficiente de Spearman mostró una correlación significativa entre ambas pruebas ( $r = 0,923$ ;  $p < 0,0001$ ). Los valores medios de carga viral obtenidos con VERSANT HBV fueron superiores a los obtenidos con COBAS Taqman, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $4,72 \pm 1,83$  vs  $4,47 \pm 2,42$ ,  $p = 0,067$ ). En 8 de los 38 casos (21,1%), la diferencia de concentración de VHB por ambos métodos fue superior a 0,5log.

**Conclusiones:** La cuantificación del genoma de VHB mediante COBAS Taqman presenta una mayor especificidad que la técnica VERSANT HBV. COBAS Taqman permite detectar con garantías un bajo grado de replicación viral y, de esta manera, determinar una posible reactivación o resistencia al tratamiento.

## 411

### EFICACIA COMPARADA DE LA DETECCIÓN DE IGM ESPECÍFICA Y DE ARN POR RT-PCR EN EL CONTEXTO DE UN BROTE DE RUBÉOLA

M. Mosquera<sup>1,3</sup>, J.C. Sanz<sup>2</sup>, F. de Ory<sup>1,3</sup>, N. Herranz<sup>2</sup>, M. Fernández<sup>2</sup>, I. González<sup>1,3</sup>, J.E. Echevarría<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. <sup>2</sup>Unidad de Microbiología Clínica, Laboratorio de Salud Pública de la Comunidad de Madrid. <sup>3</sup>Agrupación de Enfermedades Infecciosas y Salud Internacional, CIBER de Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP.

La rubéola es una enfermedad de la infancia de curso benigno, pero que cuando afecta a mujeres embarazadas puede infectar al feto produciendo aborto o síndrome de rubéola congénita si el embarazo llega a término. Por esta razón constituye supuesto legal de aborto terapéutico, situación que exige un diagnóstico etiológico tan sensible como específico. La rubéola se administra como uno de los componentes de la vacuna triple vírica, la cual forma parte del calendario vacunal español desde 1981, aunque durante los años 70 ya se había administrado como vacuna monovalente en varias campañas dirigidas a niñas de 11 años. En los demás países europeos la situación es similar, por lo que la Oficina Europea de la OMS se ha planteado su eliminación junto con el sarampión, lo cual obliga a realizar una intensa vigilancia epidemiológica articulada en planes nacionales como el español, que, de nuevo, requieren de un diagnóstico etiológico de máximas prestaciones. La herramienta diagnóstica de referencia es la detección de IgM específica, técnica que no está exenta de dar, tanto resultados negativos si el muestreo es excesivamente temprano, como falsos positivos que obligan a su inexcusable confirmación por ensayos de avidez de IgG, muy especialmente en el caso de infecciones en la mujer embarazada. La detección de genoma de virus de la rubéola por RT-PCR es una técnica muy extendida para el diagnóstico del síndrome de la rubéola congénita tanto prenatal como postnatal. Sin embargo, no está suficientemente valorada su utilidad en el diagnóstico de la rubéola como complemento de la detección de IgM. En el presente trabajo se presentan resultados de marcadores de infección por virus de la rubéola (IgG, IgM y RT-PCR en suero, orina y exudado faríngeo) en una serie de pacientes de un mismo brote de rubéola ocurrido en Madrid en 2004-2005 que afectó a 460 personas. El marcador de infección más sensible resultó ser la IgM, sin embargo, un 23,8% de los casos, solo pudo ser diagnosticado por RT-PCR, siendo la IgM negativa. En conclusión, la máxima sensibilidad en el diagnóstico de la rubéola requerida para el diagnóstico en la mujer embarazada y la vigilancia epidemiológica asociada al Plan Nacional de Eliminación solo se consigue cuando la prueba de IgM específica se acompaña de detección genómica en exudado faríngeo.

## 412

### ¿QUE APORTA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) AL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS POR ADENOVIRUS?

L. Villa<sup>1</sup>, M. de Oña, M.E. Álvarez, E. Gómez, A. Templado, J. Rodríguez<sup>2</sup> y S. Melón

Sección de Virología. Servicio de Microbiología<sup>1</sup>, Servicio de Pediatría, H. Universitario Central de Asturias (HUCA). Oviedo.

**Objetivos:** Comparar los métodos biológicos utilizados rutinariamente, con los métodos genómicos para el diagnóstico de las infecciones producidas por Adenovirus en niños.

**Materiales y métodos:** Para llevar a cabo los objetivos se estudiaron un total de 883 muestras (418 exudados faríngeos, 462 nasales y 3 lavados broncoalveolares), pertenecientes a niños menores de 15 años y con diagnóstico clínico de infección respiratoria, 419 (47,5%) presentaban síntomas de infección del tracto respiratorio inferior (IRVB), 217 (24,6%) mostraban síntomas del tracto respiratorio superior (IRVA). El resto 247 (28%) presentaban síntomas inespecíficos de infección respiratoria, entre ellos fiebre. Las muestras fueron procesadas para detección de antígeno viral (IF) y preparadas para inocular en cultivo rápido ("shell-vial") y convencional en distintas líneas celulares (MDCK, LLC-MK2 y MRC-5) según protocolos establecidos. La extracción del material genómico se realizó mediante el COBAS Ampliprep (Roche) y se llevó a cabo una PCR-nested, para la detección de Adenovirus.

**Resultados:** En 129 muestras (14,61%) se detectó Adenovirus. Del total de las muestras, 31 (24,0%) fueron positivas por IF, 71 (55,0%) tuvieron un "shell-vial" positivo y en 86 (66,7%) el cultivo convencional (CC) fue positivo. En cuanto a las técnicas moleculares, la PCR detectó Adenovirus en 106 (82,2%) muestras. De las 129 muestras en las que se encontró Adenovirus, en 38 (29,4%) se detectó mediante métodos moleculares (PCR), en 23 (17,9%) se aisló únicamente mediante métodos biológicos (IF, SV, CC) y en 68 (66,7%) por combinación de ambos métodos. Con respecto al tipo de muestra de los 418 exudados faríngeos, 96 (23%) fueron positivos: 15 (15,6%) por métodos biológicos, 10 (31,2%) únicamente mediante detección genómica y 28 (29,1%) por combinación de ambos. En 32 (7,44%) de los 462 nasales se detectó Adenovirus: en 7 (21,9%) muestras se aisló por métodos biológicos, 10 (31,2%) mediante métodos moleculares y en 15 (46,9%) por ambos. Con respecto al diagnóstico clínico, 44 (5%) tenían IRVA, 39 (4,4%) presentaban un síndrome febril y 36 (4,1%) tenían IRVB.

**Conclusiones:** El cultivo rápido ("shell-vial") es significativamente más sensible que la detección de antígeno. La PCR es significativamente más sensible que el "shell-vial" y que la IF, pero similar al cultivo convencional. En función del tipo de muestra el exudado faríngeo es significativamente más sensible que el nasal. El Adenovirus se detecta por igual en todas las patologías respiratorias establecidas.

## 413

### SUSTITUCIÓN DE LA ANTIGENEMIA PP65 DE CMV POR PCR A TIEMPO REAL EN PACIENTES TRASPLANTADOS

A. Fernández, A. Cañizares, M.J. G<sup>a</sup>-Triñanes, M. Lobato y R. Villanueva

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo. A Coruña.

**Introducción:** La infección por CMV es la principal causa de morbilidad y mortalidad de origen viral en pacientes trasplantados. En nuestro hospital, hasta el mes de Diciembre de 2007 se ha utilizado para la instauración de la terapia anticipada y el control de la infección por CMV la detección del antígeno pp65 (Ag pp65). Se valoró la sustitución de esta técnica por PCR a tiempo real (PCR TR), buen método cuantitativo con alta sensibilidad y especificidad que permite extracción automatizada y del que disponemos kits comerciales en la actualidad. Para ello realizamos un trabajo de correlación entre Ag pp65 y PCR TR, así como entre dos técnicas de PCR TR disponibles en el mercado.

**Material y métodos:** 97 plasmas procedentes de 26 pacientes trasplantados y 1 paciente VIH positivo.

PCR TR 1: LightCycler® CMV Quant Kit (Roche) adaptada a extracción genérica con el MagnaPure Compact. (Roche). PCR TR 2: Affigene® CMV trender (bioMérieux) adaptada a extracción genérica con el NucliSens® Easy MagTM. (bioMérieux) Ag pp65: CINAKit Rapid Antigenemia test (Argene), según instrucciones del fabricante.

**Resultados:** La sensibilidad de las dos técnicas de PCR TR fue similar y más sensible que la Ag pp65. El coeficiente de correlación de Spearman para las dos PCR TR fue de 0,818 ( $p < 0,001$ ). Para la PCR TR 1 y la Ag pp65 fue de 0,808 ( $p < 0,001$ ). Agrupamos las muestras en cuatro categorías según el resultado de la Ag pp 65; grupo I: Ag pp 65 negativa, grupo II: 1-10, grupo III: 11-100 y grupo IV: mayores de 100 céls Ag+/100.000 leucocitos. La mediana del nº de copias de DNA de CMV fue de 2,78 Log copias/ml (media: 2,76) para el grupo I; de 3,18 Log copias/ml (media: 3,18); 4,05 Log copias /ml (media: 4,09) y 5,09 Log copias/ml (media: 5,15) para las muestras de los grupos II, III y IV, respectivamente. Se analizó la concordancia entre los resultados de las PCR TR 1 y 2. Para las 63 muestras que fueron positivas por ambas técnicas el valor medio de la carga viral (DS) fue de 3,526 (1,023) Log copias/ml para la PCR TR 1 y de 3,461 (1,152) Log copias/ml para la PCR TR 2. La línea de tendencia de la carga viral en el seguimiento de los pacientes fue similar por las tres técnicas y se observó la anticipación de la detección del CMV por PCR TR con respecto a la Ag pp65. El tiempo de obtención de resultados fue sensiblemente menor en la PCR TR 1.

**Conclusiones:** La PCR TR para la detección de CMV mejora la precocidad del diagnóstico, pudiendo adelantar el tratamiento anticipado. También facilita la rutina en el laboratorio y evita el rechazo de muestras. Hacen falta estudios clínico-virologicos para establecer puntos de corte para la toma de decisiones clínicas.

## 414

### APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN GENOMICA ("SEPTIFAST") EN EL ESTUDIO DE BACTERIEMIAS Y/O FUNGEMIAS

F. Pérez, A. Blanco<sup>1</sup>, R. Ortega, A. Pérez, T. Fernández-Díaz, C. Iglesias y S. Melón

Servicios de Microbiología y Medicina Intensiva<sup>1</sup>, Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. España.

**Objetivos:** Valorar la aportación de una técnica de detección genómica comercial (Septifast, Roche, USA) en el diagnóstico de las bacteriemias y/o fungemias.

**Material y métodos:** Desde julio de 2007 hasta octubre de 2007, paralelamente a la recogida de hemocultivos convencionales (sistema ESP), se recogieron 69 muestras de sangre periférica con anticoagulante en el servicio de medicina intensiva. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron a 4°C incluso hasta 1 semana después de su recogida. Posteriormente se procesaron según las instrucciones del fabricante. En 12 muestras se llevó a cabo también un protocolo de extracción genómica automática (Ampliprep, Roche), para posteriormente seguir los pasos de amplificación según el protocolo establecido.

**Resultados:** De las 69 muestras, 5 no fueron válidas en la amplificación. De las 64 muestras valoradas, 10 (15%) resultaron tener algún microorganismo en el ESP que podía ser identificable por el "Septifast" (3 *Escherichia coli*, 2 *Enterococcus faecalis*, 1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Acinetobacter baumanii*, 1 *Staphylococcus warnierii*). Además en el ESP se aislaron 1 *Hafnia Alves*, 1 *Eubacterium limosum*, 1 *Propionobacterium acnes*.

El Septifast logró detectar 10 microorganismos (15%): 4 de los ESP positivos (2 *E. coli*, 1 *E. cloacae* y 1 *P. aeruginosa*) y 2 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Candida albicans*, 1 *Candida parasilopsis*, y 2 infecciones polimicrobianas (*K. pneumoniae* + *A. baumanii* + *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* + *E. cloacae*)

Las muestras concordantes de ambas técnicas fueron 52 (81,25%). El Septifast presentó algunos problemas con los controles internos y algunos controles positivos.

Con la extracción automática, 2 muestras resultaron inespecíficas, 2 fueron negativas con ESP positivo (*K. oxy-*

toca y *Enterobacter baumanii*), 6 fueron coincidente con ESP (1 *K. pneumoniae*, 1 *E. coli*, 1 *P. aeruginosa*, 1 *C. Parrasilopsis*, 2 negativos) y en 2 se detectó una *E. coli* (aislado en otro ESP del mismo paciente) y una *K. pneumoniae* + *P. aeruginosa* (identificado en la extracción manual).

**Conclusiones:** A pesar de las discrepancias que todavía se observan con los métodos convencionales, las técnicas de detección genómica pueden ser una alternativa rápida y complementaria en casos complicados, sobretodo en el diagnóstico fúngico. La aplicación de métodos automatizados mantiene la sensibilidad y mejora la realización de la técnica. Es necesario mejorar el desarrollo y reproducibilidad de la técnica.

## 415

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* PROCEDENTES DE HUMANOS EN ESPAÑA (PENÍNSULA Y CANARIAS)

A. Blanco<sup>1</sup>, F. Merino<sup>2</sup>, R. Elcuaz<sup>3</sup>, R. Cogollos<sup>4</sup>, R. Martínez<sup>5</sup>, M. Flores<sup>1</sup>, M. Gutierrez<sup>1</sup> e I. Fuentes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología. ISCIII. Majadahonda. Servicio de Microbiología, <sup>2</sup>Hospital de Getafe. Madrid. <sup>3</sup>Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. <sup>4</sup>Hospital de Móstoles. Madrid. <sup>5</sup>Hospital Universitario Puerta de Hierro (C.E.A.). Madrid.

**Introducción:** El protozo *Cryptosporidium* causa una enfermedad diarreica de considerable importancia en pacientes inmunodeprimidos e infantes. En países industrializados la infección suele presentarse como casos aislados o brotes de importancia en salud pública. La transmisión tiene lugar por la ingesta de agua y alimentos contaminados con ooquistas y por el contacto directo con personas y animales infectados, siendo interesante los estudios de diagnóstico y de caracterización molecular.

**Objetivo:** (i) Evaluar la utilidad de la PCR en la detección de *Cryptosporidium* en muestras frescas y fijadas; (ii) Realizar la caracterización molecular de los aislados de *Cryptosporidium* en un grupo de pacientes con criptosporidiosis mediante el análisis del gen COWP del parásito.

**Materiales y métodos:** Se estudiaron un total de 151 muestras de heces (121 en conservante con formalina y 30 frescas) procedentes de pacientes con criptosporidiosis remitidas por hospitales de la Península y Canarias. El diagnóstico inicial fue realizado por microscopía tras tinción de Ziehl-Neelsen y/o Inmunoanálisis rápida para detección de antígenos de *Cryptosporidium*. La detección molecular se realizó mediante una nested-PCR para el gen COWP, mientras que para la caracterización de los aislados se desarrolló una técnica de PCR-RFLP.

**Resultados:** La técnica de PCR amplificó en el 14,9 % (18) y 100 % (30) de las muestras fijadas y frescas respectivamente. Se consiguió realizar la caracterización molecular de 48 aislados, 31 (64,6 %) de la Península y 17 (35,4 %) de Las Palmas de Gran Canaria. Los estudios de caracterización molecular permitieron conocer que el 81,3 % de los casos de criptosporidiosis estaban causados por la especie antropónota *C. hominis* y el 16,7 % por la especie zoonótica *C. parvum*. Se detectó un caso de infección mixta procedente de Las Palmas. El 81,3 % (39/48) de los aislados caracterizados procedían de pacientes pediátricos. Los 3 aislados procedentes de un brote diarreico ocurrido en una escuela de la Comunidad de Madrid presentaron el mismo patrón correspondiente a *C. hominis*. De los 7 pacientes inmunodeprimidos estudiados, el 28,6 % (2/7) presentaron parasitación por *C. parvum*. Un caso de infección por *C. hominis* fue detectado en un adulto tras un viaje a Tailandia.

**Discusión:** La baja sensibilidad de la PCR en muestras fijadas se debe a la interacción de la formalina con el ADN. Las condiciones existentes tanto en la Península

como en Las Palmas favorecen la transmisión de especies de *Cryptosporidium* tanto de origen humano como animal.

**Conclusión:** La PCR es útil preferentemente en muestras frescas, siendo ésta la muestra de elección para las técnicas moleculares. La transmisión de *C. hominis*, responsable del ciclo antropónoto, prevalece de forma significativa en la población española estudiada.

*Financiación: Proyectos ISCIII MPY 1284/05; RICET-FIS (RD06/0021/0019); W.P ZOOPNET (RED MED VET NET).*

## 416

### DETECCIÓN Y SUBTIPADO DE GRIPE MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR

A. Tenorio<sup>1</sup>, R. Ortiz de Lejarazu<sup>1</sup>, J.M. Eiros<sup>1</sup>, J. Bermejo<sup>1</sup>, C. Hernán<sup>2</sup>, S. Rojo<sup>1</sup> y M. Domínguez-Gil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid. <sup>2</sup>Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública, Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Centro Nacional de Gripe.

**Introducción:** Las infecciones respiratorias agudas son la primera causa de patología infecciosa en humanos. El aislamiento o detección y subtipado del virus de la gripe informan sobre su evolución epidémica y proporcionan las herramientas necesarias para producir la vacuna antigripal anual.

**Objetivos:** Evaluar la aplicación en el diagnóstico y subtulado de gripe de una técnica de RT-PCR y conocer la evolución epidémica del virus de la gripe en la temporada 2007-2008 en Castilla y León.

**Material y métodos:** Se analizaron 48 muestras remitidas por Médicos Centinelas de Castilla y León al laboratorio del Centro Nacional de Gripe de Valladolid, para estudio del virus de la gripe. Las muestras se analizaron en paralelo por shell vial y PCR. Para el cultivo en shell vial, se utilizaron células MDCK. El revelado se hizo con anticuerpos monoclonales frente a gripe A y gripe B, procediéndose a su lectura en el microscopio de fluorescencia. Para el análisis por PCR se utilizaron técnicas de RT-PCR múltiple, de detección simultánea de gripe A, gripe B, gripe C, virus respiratorio sincitial (VRS) tipo A y tipo B y adenovirus. Las muestras positivas a gripe A por PCR, se subtalaron por la hemaglutinina mediante la misma técnica. Se aplicó una tercera técnica en 12 muestras positivas a gripe A por RT-PCR, basada en microarrays (Clinical Array® Pneumovir, genómica, Spain) para establecer la correlación con la RT-PCR.

**Resultados:** Mediante shell vial se aislaron 6 virus gripeales A y 3 virus gripeales B. Por RT-PCR múltiple se detectaron 23 virus gripeales A (23 H1), 11 virus gripeales B, 2 adenovirus y un VRS tipo B. Al comparar los hallazgos obtenidos por detección molecular de virus gripeales, la correlación con el cultivo celular fue del 100%. Además, por RT-PCR se detectaron 3 coinfecciones: 1 gripe B/adenovirus, 1 gripe A/gripe B y 1 gripe A/adenovirus. Las 12 muestras positivas frente a gripe A por RT-PCR y analizadas por microarrays, mostraron una correlación del 100%, además con esta nueva técnica, en 4 de ellas se detectó coinfección con VRS A, y en 1 con coronavirus 229E.

**Conclusiones:** En nuestra serie, la RT-PCR presentó una correlación excelente con los positivos por cultivo, y ofreció un rendimiento 4 veces superior en la detección de virus gripeales, además de permitir subtalar la gripe A y detectar otros virus no cultivables implicados en patología respiratoria, así como verificar coinfecciones. En síntesis, podemos apuntar que estas técnicas moleculares aportan mayor rapidez, sensibilidad y espectro diagnóstico, complementando al cultivo tradicional, que por otra parte, sigue siendo necesario para la recuperación del virus con fines al desarrollo de vacunas.

**417****DETECCIÓN DE PORTADORES NASALES DE SARM MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR)**

C. Morales<sup>1</sup>, A. González<sup>1</sup>, A. Calderón<sup>2</sup>, C. Gallés<sup>3</sup>, P. Pérez<sup>4</sup>, G. Sauca<sup>6</sup>, R. Vidal<sup>5</sup> y M. Salvadó<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología LRC-H. Mar, Laboratori de Referència de Catalunya -H. Mar. <sup>2</sup>Microbiología Hospital Municipal de Badalona. <sup>3</sup>S. Microbiología Corporació de Salut del Maresme i la Selva. <sup>4</sup>S. Microbiología Consorci Hospitalari de Terrassa. <sup>5</sup>S. Microbiología Hospital de Mollet.

<sup>6</sup>S. Microbiología Consorci Sanitari del Maresme.

**Introducción:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) se ha diseminado por todo el mundo, fundamentalmente en las últimas dos décadas, siendo responsable de una significativa morbilidad y mortalidad. La estrategia de control pasa por la detección rápida de los portadores de SARM. Los cultivos tradicionales son lentos (2-3 días) por lo que sería de gran utilidad la implantación de técnicas moleculares que permitan un diagnóstico en pocas horas.

**Métodos:** Se estudió la eficacia de un método de PCR a tiempo real (RT-PCR) (Light Cycler Roche™) en un estudio de cribaje en portadores nasales comparado con el cultivo. A un total de 150 muestras nasales pertenecientes a 132 pacientes con riesgo de estar colonizados, se les aplicaron dos métodos de detección; por RT-PCR y por cultivo en CNA agar sangre y en medio cromogénico MRSA ID (Biomerieux). La extracción del DNA a partir del escobillón nasal se realizó mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche diagnostics). La RT-PCR detectó simultáneamente la especie de *Staphylococcus* (LightCycler Staphylococcus Kit M<sup>GRADE</sup>) y el gen *mecA* (LightCycler MRSA Detection Kit) mediante curvas de fusión. La identificación de las especies de *Staphylococcus* aisladas en los cultivos y las pruebas de sensibilidad fueron realizadas por los métodos convencionales.

**Resultados:** De las 150 muestras, 31 fueron positivas por ambos métodos y 97 negativas. La RT-PCR detectó la presencia de gen *mecA* en 6 muestras negativas por cultivo, mientras que se obtuvo crecimiento de SARM en 3 muestras que fueron negativas por PCR y 13 mostraron un resultado indeterminado (presencia de gen *mecA*, *S. aureus* y *Staphylococcus plasmocoagulasa* negativos en la misma muestra). La RT-PCR presentó una sensibilidad del 91,18% y una especificidad del 94,17%. Se obtuvo un valor predictivo positivo de 83,78% y un valor predictivo negativo de 97%. El tiempo de detección por RT-PCR fue inferior a 2 horas, significativamente más reducido que el tiempo medio obtenido por cultivo (55,64 horas).

**Conclusiones:** A pesar de los resultados indeterminados (la utilización de técnicas que detectan el cassette cromosómico SCCmecA resuelven este problema) se demuestra que los portadores de SARM pueden ser identificados mediante métodos moleculares y que su uso puede ayudar a los programas de control de la infección nosocomial. El coste más elevado de estas técnicas puede estar compensado por la disminución de recursos en aislamientos preventivos y en tratamientos antibióticos innecesarios.

**418****COMPARACIÓN DEL CULTIVO Y LA PCR A TIEMPO REAL EN LA DETECCIÓN DE LEGIONELLA spp**

M.D. Ocete, J.L. Alfonso, G. Marcaida, G. Sáez, M. Jiménez, R. Llucián y S. Donderis

Unidad de Microbiología, Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Valencia.

**Objetivo:** Comparar el cultivo (método de referencia y la PCR a tiempo real (PCR-RT) para la detección de Legionella spp. en muestras de agua.

**Material y métodos:** Se analizaron 140 muestras de agua procedentes de la red de distribución de agua sanitaria (fria y caliente) mediante cultivo (Norma UNE-ISO 11731:1998) que demuestra la presencia o ausencia de Legionella spp y estima el número de unidades formadoras de colonias (ufc) en volumen de muestra original; y mediante PCR-RT para la amplificación de un fragmento específico del genoma de la bacteria, que consta de las siguientes partes: concentración de las muestras de agua por filtración, lisis bacteriana, extracción y purificación de los ácidos nucleicos ("High Pure Template Preparation Kit" (Roche®)), detección y cuantificación de Legionella spp mediante LightCycler 2.0 (Roche®) utilizando para la mezcla de reacción el kit LightCycler Fast-Start DNA Master Plus Hybridization Probes (Roche®) y un control interno de inhibición (LightCycler kit DNA (Roche®)). Se utilizan cebadores que amplifican un fragmento de 386 pb del gen 16S rRNA de Legionella spp. Los productos de amplificación se detectan mediante el empleo de sondas de hibridación marcadas con fluorocromos. Los resultados se expresan en número de copias de DNA/Litro. Se realizó el análisis estadístico mediante el test Chi-Cuadrado para los resultados cualitativos y regresión lineal para los cuantitativos.

**Resultados:** Del total de muestras analizadas el resultado del análisis fue positivo en el 30% de los cultivos y en el 38,6% por PCR-RT. Se observó asociación, estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ), entre los resultados positivos y negativos obtenidos por ambos métodos. El análisis de correlación entre los resultados cuantitativos obtenidos por cultivo ( $\log \text{ufc/L}$ ) y por PCR-RT ( $\log \text{nº copias DNA/L}$ ) de las muestras analizadas, demuestra la existencia de relación estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre ambos resultados (ecuación:  $\log \text{nº copias DNA/L} = 0,7009 + 0,7416 * \log \text{ufc/L}$ ). El coeficiente de correlación lineal entre ambos resultados es de 0,655.

**Conclusiones:** Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las muestras estudiadas, podemos concluir que el valor, positivo o negativo, observado por cultivo tiene relación con el resultado positivo o negativo obtenido por PCR-RT. Existe una correlación significativa entre el  $\log \text{ufc/L}$  (cultivo) y el  $\log \text{nº copias DNA/L}$  (PCR-RT).

**419****UTILIZACIÓN DE GENOTYPE MTDR PLUS PARA CONOCER LA SENSIBILIDAD DE *M. TUBERCULOSIS* EN MUESTRAS CLÍNICAS DIRECTAMENTE**

M.J. Unzaga, R. Blanco, L. García, A. Isabel Morla, I. Gerediaga, B. Amezua, M. Sánchez, C. Ezpeleta, J.A. Álava y R. Cisterna  
Servicio de Microbiología, Hospital de Basurto.

**Objetivo:** El objetivo del estudio fue conocer las posibilidades de una detección rápida en muestra directa, según las recomendaciones del fabricante, de la sensibilidad de *M. tuberculosis* a isoniacida (INH) y Rifampicina (RIF) respectivamente.

**Métodos:** Un total de 18 muestras de esputo, tratadas con Na OH-N acetil cisteína y almacenadas a -20°C hasta el análisis, fueron seleccionadas por haberse aislado *M. tuberculosis* previamente de ellas. El resultado de la baciloscopía en 16 de ellas fue positivo y mientras que dos de ellas habían sido negativas. Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante el sistema BACTEC 960 Becton Dickinson. La prueba molecular de sensibilidad Genotype MYDR plus se realizó a partir de un alícuota de 500 µl de la muestra pretratada, se centrifugó a 10.000 x g, 15 min. El pellet se suspendió en TE (100 µl) y se inactivó por calor (95 °C, 15 min). El DNA se extrajo mediante ultrasonificado a temperatura ambiente 15 min, seguido por una centrifugación a 10.000 x g 15 min.) La amplificación se realizó con 5 µL del DNA extraído, desnaturización (95 °C 5 min.); 10 ciclos de (95°C, 30s y 58 °C 2 min.); 30 ciclos de (95 °C 25 s; 53 °C 40s y 70 °C 40s) y una extensión final a 70 °C durante 8 min.

**Resultados:** Las 18 muestras eran sensibles a los dos antibióticos testados INH y RIF mediante el sistema Bactec 960.

En el caso de INH tanto concentración baja y como alta. Mediante el sistema Genotype MTDR plus se obtuvieron similares resultados en las 16 muestras baciloskopías positivas, esto es las tira de DNA podían ser interpretadas fácilmente y se correlacionaban correctamente con los datos de sensibilidad obtenidos mediante BACTEC 960. Sin embargo las dos muestras que fueron baciloskopías negativas no se pudo interpretar el gen inhA por ausencia de hibridación de la sonda "wild type" del gen inhA, pero no así con los genes katG y rpoB.

**Conclusiones:** El sistema MTDR plus es una prueba fácil y rápida de realizar y con resultados satisfactorios sobre todo en las muestras que son baciloskopías positivas para la detección de las mutaciones más comunes en los genes katG, inhA y rpoB en M tuberculosis. Esto permite ajustar los tratamientos desde el inicio del diagnóstico.

## 420

### EVOLUCIÓN DE LA CARGA BACTERIANA DE *BRUCELLA MELITENSIS* EN PACIENTES CON BRUCELOSIS

J.C. Segura<sup>1</sup>, M.J. Castaño<sup>2</sup>, E. Navarro<sup>2</sup>, E. Martínez-Alfaro<sup>3</sup>, Ll. Garijo<sup>1</sup>, M.D. Muñoz<sup>3</sup>, J.L. Beato<sup>4</sup>, S. Lorente<sup>5</sup>, C. Romero<sup>6</sup> y J. Solera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Medicina Interna, <sup>2</sup>Unidad de Investigación, <sup>3</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario de Albacete. <sup>4</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital de Hellín (Albacete). <sup>5</sup>Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Albacete. <sup>6</sup>Servicio de Microbiología, Hospital de Hellín (Albacete).

Se describe la evolución de la carga bacteriana (copias de ADN de *B. melitensis*/ml sangre) en pacientes con brucelosis aguda en la fase previa al inicio del tratamiento (basal), durante el tratamiento y en el seguimiento una vez finalizada la terapia antibiótica. Los pacientes se separaron en dos grupos según la evolución de la enfermedad tras el tratamiento: pacientes que no recidivan (grupo I) y pacientes que recidivan (grupo II). Se aplicó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCRQ) y se analizó 103 y 90 muestras de sangre periférica pertenecientes a 14 pacientes del grupo I y a 8 pacientes que sí presentaron una recidiva (grupo II). A cada muestra se le realizó hemocultivos y test serológicos (Rosa de Bengala, SAT y Coombs).

En el episodio agudo, la evolución de la carga bacteriana es similar en ambos grupos de pacientes. Parten con una carga basal de  $1619 \pm 2076$  copias/ml (media, d.t.) y de  $2778 \pm 3909$  copias/ml para el grupo I y II respectivamente. Durante el primer mes de tratamiento la carga disminuye en ambos grupos siendo significativa sólo en el grupo de los que curan ( $p = 0,03$ ). Entre el día 29 y el final del tratamiento la carga aumenta aunque no significativamente ( $p = 0,205$ ) en ambos grupos hasta  $930 \pm 2105$  copias/ml y  $677 \pm 1115$  copias/ml en el grupo I y II, respectivamente.

En el seguimiento de los pacientes del grupo I, la carga bacteriana disminuye hasta  $120 \pm 274$  copias en los tres primeros meses. Despues, aumenta ligeramente hasta el noveno mes de seguimiento  $220 \pm 475$  copias/ml. Al final del seguimiento, la carga bacteriana es de  $22 \pm 34$  copias/ml, para el 50% de los pacientes.

En los pacientes que recidivan, la carga bacteriana disminuye hasta  $83 \pm 78$  copias/ml durante los dos primeros meses de seguimiento hasta el momento de la recidiva. La carga bacteriana basal entonces es de  $4626 \pm 7013$  copias/ml la cual desciende progresivamente desde el inicio del tratamiento hasta el final del seguimiento.

Detectamos ADN de *Brucella melitensis* de forma intermitente en pacientes con brucelosis después del tratamiento, a pesar de una buena respuesta al mismo. No hemos determinado un nivel de carga basal que pueda predecir la recidiva. Sin embargo, el descenso durante el primer mes de tratamiento sólo fue significativo para el grupo de pacientes que no recidiván.

## 421

### MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS GENÓMICOS EN *COXIELLA BURNETII*

I. Jado, H. Gil, B. Lobo, R. Escudero, C. García-Amil, M. Rodríguez-Vargas, P. Roales y P. Anda

Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales; Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

**Introducción.** Las manifestaciones clínicas de la infección aguda por *Coxiella burnetii* presentan claras diferencias entre áreas geográficas, produciendo desde un cuadro respiratorio que puede desembocar en neumonía, hasta cuadros de fiebre de duración intermedia con mayor o menor afectación hepática. La evolución a cuadros crónicos como endocarditis, hepatitis granulomatosa, infección vascular y osteomielitis, entre otras, parece claramente relacionada con lesiones valvulares previas en el caso de la endocarditis, no existiendo una hipótesis establecida para el resto de las manifestaciones crónicas. Dada la dificultad de cultivo de este agente, que requiere el uso de cultivos celulares e instalaciones de nivel 3 de bioseguridad, la disponibilidad global de cepas y, por tanto, de metodología de caracterización para el establecimiento de relaciones clínicas, es insuficiente. Con la reciente publicación de la secuencia completa del genoma de *C. burnetii* se ha descrito la existencia de diferentes grupos genómicos, aunque dada la dificultad de la metodología empleada, su relación con las diferentes manifestaciones clínicas no ha sido evaluada.

Presentamos un método molecular multiplex para la determinación de los diferentes grupos genómicos de este agente.

**Objetivos:** Desarrollar un método para la determinación de grupos genómicos en *C. burnetii*.

**Material y métodos:** Se localizaron en el genoma 7 genes cuya ausencia determinaba la pertenencia de los aislados a cada uno de los grupos genómicos descritos. Se diseñaron cebadores y sondas específicos para cada uno de los genes que, posteriormente, se multiplexaron en un único protocolo de amplificación. Los resultados se revelaron mediante hibridación en fase sólida con sondas específicas diseñadas para cada una de las 7 dianas. La especificidad se determinó frente a ADN de diferentes especies bacterianas cercanas (*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Francisella*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Mycoplasma*, *Orientia*, *Leptospira*, *Brucella* y *Treponema*), así como frente a ADN humano.

**Resultados:** La sensibilidad para cada una de las dianas se situó entre 10 y 100 equivalentes de genoma y la especificidad resultó del 100% con las muestras ensayadas. Todos los aislados disponibles en la colección del CNM, así como muestras de pacientes positivas, fueron clasificados por este método, observándose asociaciones entre cuadro clínico y grupo genómico.

**Conclusiones:** Presentamos un método rápido, sensible y específico para la caracterización de *C. burnetii* mediante la determinación de grupos genómicos.

*Financiación: INIA (FAU2006-00002-004-00)*

## 422

### UTILIDAD DE UNA TÉCNICA DE REAL-TIME PCR CUANTITATIVA PARA DISCRIMINAR ENTRE BRUCELOSIS ACTIVA Y PASADA

J.D. Colmenero<sup>1</sup>, M.I. Queipo-Ortuño<sup>2</sup>, J.M. Reguera<sup>1</sup>, M. Delgado<sup>1</sup>, P. Martín-Rico<sup>1</sup> y P. Morata<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga. <sup>2</sup>Fundación IMABIS, Complejo Hospitalario Carlos Haya, Málaga. <sup>3</sup>Dpto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Málaga.

**Introducción:** El diagnóstico de la brucelosis puede ser difícil en diferentes escenarios (enfermedad reciente, sujetos profesionalmente expuestos etc.) donde las técnicas microbiológicas convencionales poseen importantes limitaciones.

**Objetivo:** Desarrollar y verificar la eficacia diagnóstica de una técnica de real-time PCR cuantitativa (LC Q-PCR) susceptible de ser aplicada al diagnóstico diferencial entre brucelosis activa y exposición asintomática o brucelosis pasada.

**Material y métodos:** Se han estudiado 110 muestras de suero pertenecientes a 46 pacientes con brucelosis y 64 controles (pacientes con brucelosis reciente, sujetos asintomáticos expuestos y pacientes con síndrome febril de otra etiología). La LC Q-PCR fue realizada con la tecnología Light Cycler amplificando secuencias específicas del gen que codifica la proteína de 31 kDa (BCSP31). Solo se incluyeron en el estudio aquellos que cumplieran uno de los siguientes criterios: 1º Aislamiento de *Brucella* spp en sangre u otra muestra clínica, ó 2º Presencia de una complicación focal típica de brucelosis (sacroileitis, espondilitis, orquiepididimitis etc) junto a la demostración de títulos altos de Ac específicos o seroconversión. La eficacia diagnóstica fué valorada midiendo el área bajo la curva (ROCs) de diferentes puntos de corte de carga bacteriana.

**Resultados:** De los pacientes con brucelosis, 28 (60,9%) eran varones y 18 (39,1%) mujeres, con una edad de  $42,5 \pm 16,4$  años. La duración del cuadro clínico de  $7,3 \pm 11,1$  sem (rango, 1-65). Veintiocho pacientes (60,9%) tenían fiebre sin foco aparente y 18 (39,1%) una o más complicaciones focales. Los hemocultivos fueron positivos en 32 pacientes (69,6%) correspondiendo todas las cepas aisladas a *B. melitensis*. Los títulos de SAT y Bcapt estuvieron dentro del rango diagnóstico en el 67,4% y 89,1% de los casos respectivamente. Ambos tests fueron negativos o estuvieron por debajo del rango diagnóstico en el 10,8% de los casos. La sensibilidad analítica de la LC Q-PCR fue  $1:10^1$  fg de DNA de *Brucella*. Cualitativamente considerada, la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 95,7%, 92,2%, 89,8% y 96,7% respectivamente, con una LR positiva de 12,2 (95% CI, 5,3-28,5) y negativa de 0,05 (95% CI, 0,01-0,18). El ciclo umbral medio de los pacientes y controles fueron  $31,8 \pm 1,7$  y  $35,4 \pm 1,1$ , respectivamente,  $p < .001$ . El mejor cut-off para la carga bacteriana medida por LC Q-PCR fue  $5 \times 10^3$  copias/mL. Con este cut-off, el área bajo la curva ROC fue 0,963 (95% CI, 0,920-1,005); sensibilidad 93,5% y especificidad 98,4%.

**Conclusiones:** En las condiciones descritas, la LC Q-PCR en muestras séricas parece ser una prueba altamente reproducible, rápida, sensible y específica. Por tanto, podría ser una herramienta muy útil, tanto para el diagnóstico inicial, como para diferenciar entre brucelosis activa y exposición asintomática o brucelosis remota.

## 423

### VARIABILIDAD DE ESPECIES DE BARTONELLA EN ESPAÑA

H. Gil<sup>1</sup>, C. García-Estebaran<sup>1,2</sup>, A. Toledo<sup>3</sup>, R. Escudero<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Vargas<sup>1</sup>, J. Barandika<sup>4</sup>, X. Gerrikagoitia<sup>4</sup>, P. Roales<sup>5</sup>, E. Chaparro, I. Jado<sup>1</sup>, A. Pérez<sup>5</sup>, S. Jiménez<sup>5</sup>, S. Olmeda<sup>3</sup>, M. Barral<sup>4</sup>, A.L. García-Pérez<sup>4</sup> y P. Anda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital de Getafe.

<sup>3</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

<sup>4</sup>Departamento de Sanidad Animal, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER Tecnalia). <sup>5</sup>Servicio de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental, Consejería de Salud de La Rioja.

**Introducción:** Dentro del género *Bartonella* se han descrito más de 20 especies que son mantenidas en la naturaleza por medio de diferentes vectores y reservorios. Su estudio clínico y ecológico se ha visto dificultado por la falta de métodos rápidos y específicos para la diferenciación de las especies pertenecientes a este género. Sin embargo, recientemente, hemos descrito un método molecular que per-

mite la identificación simultánea de hasta 20 especie diferentes. En este trabajo presentamos la aplicación de dicho método sobre muestras de diferentes vectores y reservorios.

**Objetivos:** Conocer la variabilidad de las especies de *Bartonella* presentes en diferentes muestras medioambientales.

**Material y métodos:** Mediante una PCR triplex (16S rRNA, 16S-23S rRNA y Control Interno), combinada con una hibridación inversa previamente descrita por nosotros (García-Estebaran y cols. 2008) se analizaron muestras procedentes de 147 gatos y 62 pulgas recogidas en La Rioja, 12 y 27 micromamíferos capturados en el País Vasco y en Madrid respectivamente, así como de 30 carnívoros silvestres procedentes del País Vasco. En aquellas muestras en las que se obtuvo señal de hibridación únicamente con la sonda genérica y no con las específicas, se secuencian y clonaron los amplicones, tanto del 16S rRNA como del 16S-23S rRNA, para la determinación de las especies de *Bartonella* identificadas. Con estos resultados se diseñaron sondas específicas basadas en las nuevas secuencias del espacio intergénico 16S-23S rRNA detectadas.

**Resultados y conclusiones:** El método demostró su versatilidad sobre muestras de diferente origen. En gatos y pulgas se detectó la presencia de *B. henselae* y *B. clarridgeiae*. En las muestras de micromamíferos se detectó la presencia de *B. taylorii*, así como de 7 posibles nuevas especies de *Bartonella*. Finalmente, en los carnívoros silvestres se detectó la presencia de *B. rochalimae*, agente identificado recientemente como nuevo patógeno humano, y de una nueva especie de *Bartonella*, que se encuentra circulando entre las poblaciones de tejones de nuestro país. Además, el método ha demostrado su eficacia y ha sido actualizado con nuevas sondas para su empleo en estudios clínicos y medioambientales.

## 424

### DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE PATÓGENOS INUSUALES MEDIANTE PCR E HIBRIDACIÓN INVERSA

H. Gil, C. García-Amil, B. Lobo, R. Escudero, I. Jado, I. Rodríguez-Moreno y P. Anda

Servicio de Bacteriología. Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

**Introducción:** En los últimos años, la importación de casos de enfermedades exóticas mediante viajeros, cooperantes o inmigrantes, entre otros, además de la amenaza del uso de agresivos biológicos ha obligado a un desarrollo de la capacidad de respuesta al nivel de los laboratorios. Estos deben desarrollar técnicas capaces de ofrecer una respuesta específica y rápida frente a esta potencial alerta sanitaria. La diversidad de agresivos biológicos que pueden ser utilizados, así como la inespecificidad inicial de los cuadros que producen, obliga al uso de técnicas de detección simultánea que faciliten el diagnóstico.

**Objetivos:** Desarrollo de dos PCR multiplex combinadas con una hibridación inversa (RLB) para la detección simultánea y específica de *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Burkholderia* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* y *Rickettsia* spp.

**Material y métodos:** Para el diseño de cebadores y sondas se seleccionaron las siguientes dianas, para el primer método: el gen de la cápsula (*capC*) y el factor letal (*lef*) para *B. anthracis*, el gen que codifica la proteína de activación del plasminógeno (*pla*) para *Y. pestis*, los genes relacionados con el sistema de secreción III, *orf11* y *BpSCU2* para *B. pseudomallei* y *B. thailandensis*, respectivamente, y finalmente *bmA*, cuya región N terminal es específica de *B. mallei*. Para el segundo método las dianas fueron, el espacio intergénico 23S-5S rRNA de *Rickettsia* spp, el gen de la lipoproteína de

17KDa (lpnA) para *F. tularensis* y microorganismos Francisella-like y finalmente para *C. burnetii* los genes adaA y el elemento de inserción IS1111. El método consistió en la realización de una PCR multiplex para las citadas dianas, en combinación con una hibridación inversa en la que se usaron sondas específicas. La sensibilidad de la técnica se determinó mediante el uso de cantidades entre 10 y 10<sup>3</sup> equivalentes de genoma de las especies propuestas en la técnica, y la especificidad utilizando especies diferentes a los géneros propuestos.

**Resultados:** La técnica permite la amplificación específica de las dianas elegidas y no se observan reacciones cruzadas con las otras especies bacterianas que fueron testadas. La sensibilidad en la detección de la técnica se situó entre 10 y 10<sup>2</sup> equivalentes de genoma, para los diferentes agresivos biológicos.

**Conclusiones:** El método desarrollado posee una buena sensibilidad y especificidad para la detección de los agresivos biológicos propuestos. El desarrollo de técnicas como ésta proporcionará una respuesta adecuada ante una alerta sanitaria.

*Financiación: Ministerio de Defensa, programa DN8836*

## 425

### PCR MÚLTIPLE SECUENCIAL PARA DETERMINACIÓN DE LOS SEROTIPOS CAPSULARES DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

P. Iraurgui<sup>1</sup>, M. De Toro<sup>1</sup>, M.J. Torres<sup>2</sup>, E.G. Cabrera<sup>3</sup>, J. Garnacho<sup>3</sup>, C. Ortiz-Leiva<sup>3</sup>, J.A. Lepe<sup>1</sup> y J. Aznar<sup>1,2</sup>

<sup>1,3</sup>Servicios de Microbiología y UCI, <sup>2</sup>Departamento de Microbiología Clínica de la Universidad de Sevilla, HH.UU. Virgen Del Rocío.

**Introducción/objetivos:** Valoración del esquema de 7 PCR múltiples diseñadas por el C.D.C. (Estados Unidos) para serotipado de *S.pneumoniae* invasivos obtenidos durante el año 2007 y detección de sensibilidad disminuida a fluorquinolonas.

**Material y métodos:** Se realizó a 55 cepas de *S. pneumoniae* invasivas (51 en hemocultivos y 4 en LCR) la serotipificación siguiendo el protocolo diseñado por el CDC (*J Clin Microbiol.* 2006;44:124-131). Utilizamos 29 parejas de cebadores distintos. 28 de éstas se agrupaban en 7 PCR múltiples secuenciales basadas a la distribución de serotipos en EE.UU. que no incluía al serotipo 5. En todas las PCRs se incluyó un control interno común a todos los neumocosos capsulares.

Se determinó la sensibilidad a levofloxacino y norfloxacino mediante los métodos de difusión E-test y disco-placa.

**Resultados:** En 52 (94,5%) de las cepas estudiadas se obtuvo amplificación y se identificó el serotipo en 50 (90%). Detectamos 15 serotipos diferentes con la siguiente frecuencia: serotipo 5 (12,7%), 6A/B (12,7%), 4 (11%), 1 (11%), 19A (9%), 3 (5,5%), 15A (5,5%), 14 (3,6%), 19F (3,6%), 16F (3,6%), 8 (3,6%), 35F(3,6%), 22F (1,8%), 7F (1,8%), 11A (1,8%). Siguiendo la secuencia de PCR propuestas por la CDC con la 1<sup>a</sup> PCR múltiple serotipamos el 29% (16cepas) de las cepas, con la 2<sup>a</sup> el 14,6% (8), con la 3<sup>a</sup> el 3,6% (2), con la 4<sup>a</sup> el 7,2% (4), con la 5<sup>a</sup> el 3,6% (2), con la 6<sup>a</sup> el 14,6% (8) y con la 7<sup>a</sup> el 5,5% (3).

Todas las cepas fueron sensibles a levofloxacino con una CMI 50 y CMI 90 de 1 µg/ml y 2 µg/ml respectivamente, mientras que el 28% fue resistente a norfloxacino, no asociándose esta resistencia a ningún serotipo concreto.

**Conclusiones:** El protocolo propuesto por el CDC permitió la identificación del serotipo en el 90% de las cepas. El serotipo 5 se detectó en el 12,7% de las cepas y no está incluido en el protocolo. Este estudio demuestra la utilidad del protocolo del CDC para la identificación de los serotipos de *S. pneumoniae* invasivos, pero la secuencia de PCR múltiples ha de adaptarse a la prevalencia local para optimizar su rendimiento.

## 426

### EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE PORTADORES DE *S. AUREUS* RESISTENTE A METICILINA

M.A. Domínguez<sup>1</sup>, V. Mick<sup>1</sup>, J. Perez<sup>1</sup>, A. Hornero<sup>2</sup>, M. Navarro<sup>1</sup>, M. Pujo<sup>2</sup> y R. Martín<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, <sup>2</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari de Bellvitge. IDIBELL. Universitat de Barcelona.

**Introducción:** La detección temprana de la colonización por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) sigue siendo un objetivo prioritario para evitar la transmisión hospitalaria de este patógeno. Los sistemas de cribaje convencionales requieren generalmente 24-48 horas antes de obtener el resultado. Se han desarrollado algunas técnicas rápidas basadas en métodos de PCR a tiempo real (PCR-TR) que permiten la detección de portadores a las pocas horas de haber tomado la muestra. El objetivo de este estudio fue analizar las características de un sistema comercial de PCR-TR, BD GeneOhm MRSA (BD Diagnostics), y compararlo con los métodos de cultivo convencional (CC).

**Métodos:** El estudio se llevó a cabo en 155 muestras (136 frotis nasales y 19 frotis no nasales) obtenidas de pacientes distintos desde junio a diciembre de 2007, en los que la detección del estado de colonización por SARM se consideró urgente. De cada paciente se tomaron dos muestras. Una de ellas se procesó para CC en medio de manitol-coagulasa, medio cromogénico selectivo (MRSA Select, Bio Rad) y caldo estafilocócico de enriquecimiento. La otra muestra se procesó según la técnica BD GeneOhm MRSA. Además, el resto de la suspensión procesada para PCR-RT de cada muestra fue incubada en caldo estafilocócico y sembrada en CC.

**Resultados:** El CC se consideró el método de referencia. En 29 muestras (19%) se aisló SARM del CC, en 7 de las cuales (3 frotis nasales y 4 frotis de otro origen) la PCR-TR fue negativa. En 32 muestras (21%) la PCR-TR fue positiva, de estas 25 muestras fueron consideradas verdaderos positivos, en 5 había historia previa de colonización por SARM en los últimos 2 años y en 2 no se disponía de datos valorables. La PCR-TR, comparada con el CC, mostró una sensibilidad del 79%, especificidad del 95% y valores predictivos positivo y negativo del 79% y 95% respectivamente. Considerando sólo las muestras nasales, la sensibilidad de la prueba aumentó al 89%. En todas las muestras procesadas por PCR-TR el resultado se obtuvo en un plazo inferior a 6 horas.

**Conclusiones:** La técnica de PCR-TR presenta buena sensibilidad en la detección de SARM, especialmente en muestras de origen nasal. El valor predictivo positivo se ve afectado por resultados positivos que no se confirman con el CC. El tiempo de respuesta de la PCR-TR es significativamente menor que el de los CC, sin embargo su alto coste económico limita su aplicación rutinaria en el laboratorio.

## 427

### RENDIMIENTO DE DISTINTAS MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA INVASORA SEGÚN MODELO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

D. Vicente, O. Esnal, E. Tamayo, J. Mendiola y G. Cilla  
Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián, Gipuzkoa.

**Introducción:** Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos constituyen un método rápido, sensible y específico para la detección de *Neisseria meningitidis* en muestras clínicas, especialmente en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico previo. Las muestras empleadas con más frecuencia son líquido cefalorraquídeo y suero. Recientes experiencias en nuestro hospital en donde la presencia de me-

ningococo por métodos moleculares fue constatada en sangre entera y no en suero nos llevó a diseñar este estudio. Ante la dificultad de obtener resultados en corto plazo usando muestras de pacientes, se diseñó un modelo murino en donde poder evaluar el rendimiento de la PCR para detección de meningococo en distintas fracciones sanguíneas.

**Método:** Para el modelo animal se utilizaron ratones inmunocompetentes hembras BALM/c de 20-22 gramos de peso. Cinco ratones con infección invasiva fueron sangrados mediante punción intracardiaca, cinco horas después de la inocularización intraperitoneal de una suspensión de meningococo serogrupo C ( $10^7$ - $10^8$  UFC/mL). Se fraccionó la muestra en tres alícuotas de 100 microlitros cada una (sangre entera en tubo con EDTA, suero y capa leucocitaria). Se extrajo el ADN genómico de cada alícuota mediante el kit de extracción de Qiagen. Se realizó PCR cuantitativa a tiempo real (LightCycler, Roche) para detección de ADN de meningococo (gen *ctrA*) y con iniciadores genotípicos específicos (gen *siaD*).

**Resultados:** Se detectó ADN de meningococo (genes *ctrA* y *siaD*) en las tres muestras (sangre entera, suero y capa leucocitaria) obtenidas de los cinco ratones. En todas las ocasiones el número de copias más elevado se obtuvo en la muestra de sangre entera (media  $1,6 \times 10^6$  copias/mL). En la capa leucocitaria se obtuvo una media de  $1,5 \times 10^5$  copias/mL y en el suero  $5,2 \times 10^4$  copias/mL. En tres de los cinco ratones inoculados, el número de copias detectado de los genes *ctrA* y *siaD* a partir de la muestra de sangre entera, superó en al menos dos logaritmos al obtenido de la muestra de suero.

**Conclusiones:** En el modelo de infección meningocócica invasiva, la sangre entera mostró un mejor rendimiento para la detección de ADN de meningococo que la capa leucocitaria y que el suero. Estos resultados pretenden ser corroborados en un futuro estudio en humanos con infección invasiva.

## 428

### EFICACIA DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN AUTOMATIZADO (M2000SP, ABBOT) PARA LA Detección DE ADN DE VPH MEDIANTE PCR

C. Cebada, M.T. Blanco, I. Popa, C. Lozano y C. Fernández\*  
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Puerta del Mar.

**Introducción:** La detección del virus del papiloma humano (VPH) forma parte del proceso de detección precoz del cáncer genital femenino.

**Objetivo:** Valorar la eficacia de la plataforma m2000sp, Abbott, para extraer ADN de diversas muestras recibidas en nuestro Servicio para la detección y tipificación del VPH.

**Material y métodos:** Durante el año 2007 se recibieron en nuestro laboratorio 715 muestras para diagnóstico de infección por VPH. 663 procedían de la consulta de Diagnóstico Precoz del Cáncer Genital Femenino (395 exudados endocervicales, 268 vulvares), y se recibieron por duplicado. Las 52 muestras restantes procedían de diversas consultas, fundamentalmente Dermatología, eran exudados genitales diversos (uretrales, perianales, de pene, vaginales) y recibimos un sólo escobillón por muestra.

Toma de muestras: en escobillón de algodón o alginato seco, sin medio de transporte.

Conservación: a 4°C hasta su procesamiento (máximo 7 días). Extracción de ácidos nucleicos: se añadió 1,5 ml de suero fisiológico a cada escobillón y se mezcló en vórtex durante 1 minuto; la suspensión se transfirió a un tubo de reacción y se procesó en el m2000sp usando el protocolo DNA-Plasma-BA-500.

Amplificación: 5 μl de eluido se añadió a la mezcla de reacción para amplificar un fragmento de 450 pb de la región L1 ORF, con los iniciadores de consenso MY09/MY11 siguiendo las instrucciones del fabricante (PVHfast, Genomica S.A., Madrid, España). En cada reacción se amplifica un gen endógeno (control de muestra) y un control interno (control de amplificación).

Amplificación: en un termociclador GeneAmp 2400. Detección de los amplificados: electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Genotipado de los VPH: RFLP en agarosa de alta resolución al 2,5%.

**Resultados:** 1. De las 663 muestras procedentes de la consulta de Diagnóstico Precoz, en 615 se obtuvo un resultado definitivo tras el procesamiento del primer escobillón (93%). Se consiguieron recuperar 21 (4%) muestras insatisfactorias (inhibidas o ADN indetectable) con el segundo escobillón, alcanzando un 96% de resultados concluyentes. 2. De las 52 muestras restantes, de las que sólo recibimos 1 escobillón, obtuvimos un resultado definitivo en 46 (88%).

**Conclusiones:** El sistema m2000sp ofrece una alta rentabilidad, en el proceso de extracción de ADN de diversos exudados y frotis para el diagnóstico de VPH por PCR. La disponibilidad de dos escobillones por muestra reduce significativamente el número de resultados insatisfactorios para esta determinación.

## 429

### EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CARGA VÍRICA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) POR UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

E. Martró<sup>1,2</sup>, N. García<sup>1</sup>, V. González<sup>1,2</sup>, V. Saludes<sup>1,2</sup>, L. Matas<sup>1,2</sup> y V. Ausina<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona, Badalona. <sup>2</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona. <sup>3</sup>CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Mallorca.

**Introducción:** La monitorización del tratamiento antivírico de los pacientes con infección crónica por VHC se realiza mediante la detección cuantitativa del RNA-VHC. La carga vírica a la semana 12 de tratamiento predice la probabilidad de respuesta virológica sostenida, y la determinación a la semana 4 se empieza a utilizar como criterio para acortar o prolongar el tratamiento. Las numerosas determinaciones de RNA-VHC que deben realizarse en cada paciente hace necesaria la introducción de un sistema automatizado para la extracción de ácidos nucleicos.

**Objetivos:** Evaluación del instrumento NucliSENS Easy-MAG (BioMérieux) para la determinación de la carga vírica del VHC por una técnica de RT-PCR en tiempo real con extracción manual (Real-time HCV, Abbott Molecular).

**Material y métodos:** La correlación entre la extracción manual y la automática se evaluó procesando en paralelo 36 sueros con cargas víricas de < 30 UI/mL a 50.000.000 UI/mL junto con controles positivos y negativos. Además se determinaron varios parámetros analíticos de la técnica de RT-PCR con los extraídos obtenidos por el EasyMAG: 1) Límite de detección: evaluación de 20 réplicas de cada una de tres diluciones (25, 12,5 y 6,25 UI/mL) del estándar OptiQual HCV RNA High Positive (Acrometrix); 2) Linealidad: evaluación de 5 réplicas por dilución seriada (rango:  $10^2$ - $10^6$  UI/mL) del mismo estándar; 3) Variabilidad intraserial: evaluación de 5 replicados de los calibradores A y B (1.000 y  $1,07 \times 10^7$  UI/mL, respectivamente) y una dilución del estándar ( $5,0 \times 10^4$  UI/mL); 4) Variabilidad interserial: evaluación de 5 réplicas de las mismas diluciones que en la variabilidad intraserial, en tres días diferentes.

**Resultados:** El coeficiente de correlación entre ambos métodos de extracción fue de 0,986. Las tasas de detección obtenidas en las diluciones de 25, 12,5 y 6,25 UI/mL, fueron de 100, 90 y 60%, respectivamente. En el estudio de linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,984 entre las cargas víricas esperadas y las observadas. La desviación estándar en el estudio de la variabilidad intraserial de la carga vírica expresada como  $\log_{10}$ (UI/mL) osciló entre 0,055 (calibra-

dor A) y 0,016 (calibrador B), mientras que para la variabilidad interserial fue de 0,04 a 0,096.

**Conclusiones:** La extracción automática con el EasyMAG presenta unos parámetros analíticos óptimos y una correlación muy buena con la técnica de extracción manual para la determinación de la carga vírica del VHC por la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizada en nuestro laboratorio.

## 430

### DETECCIÓN DE BOCAVIRUS EN ASPIRADOS NASOFARÍNGEOS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA CON SINTOMATOLOGÍA RESPIRATORIA ATENDIDA EN UN SERVICIO DE URGENCIAS

J. Beltrán, M. Aoufi, M. de Pablos y J. Mingorance

Servicio de Microbiología Clínica, H. Universitario La Paz. Madrid

**Introducción:** Los bocavirus son virus de ADN de cadena simple pertenecientes a la familia de los parvovirus. El primer bocavirus humano fue descrito en 2005 en aspirados nasofaríngeos de niños con síntomas de infección del tracto respiratorio. Recientes estudios han detectado su presencia en sangre y heces, aunque la relación entre la presencia del virus y la enfermedad no ha sido demostrada.

El objetivo de este estudio es analizar la prevalencia entre la población pediátrica con sintomatología respiratoria atendida en el Servicio de Urgencia Infantil del Hospital La Paz, estudiar la diversidad genética de los virus detectados en nuestra población y describir la sintomatología asociada a la presencia del virus.

**Material y métodos:** Como parte del procedimiento rutinario se recogieron 290 aspirados nasofaríngeos de niños con edades comprendidas entre 1 mes y 3 años procedentes del Servicio de Urgencia Infantil del Hospital La Paz durante los meses de febrero a junio de 2007. Se purificaron los ácidos nucleicos totales a partir de 0,2 mL de muestra (Nucli-sens® easyMAG®, Biomerieux). La detección se realizó mediante PCR convencional, dirigida al gen NS-1 mediante los oligonucleótidos 188F y 542R. Las muestras positivas fueron confirmadas amplificando el gen NP-1 empleando los oligonucleótidos HBoVo1.2 y HBoVo2.2.

**Resultados:** En las 290 muestras estudiadas se detectaron 12 positivas para el gen NS-1, en todas ellas se confirmó la presencia de bocavirus amplificando el gen NP-1 (4,14%). Estos 12 casos correspondieron a niños con edades comprendidas entre 3 y 21 meses y la sintomatología que presentaban incluía disnea (5 niños), tos (10), fiebre (8) y riorrea (7). En 3 casos fue detectada coinfección con influenza A, adenovirus y VRS.

**Conclusiones:** La prevalencia de infección o coinfección por bocavirus en la población estudiada fue de un 4,14% (resultado inferior a la mayoría de los estudios publicados en la literatura). En la mayoría de los casos no se detectó coinfección con otros virus conocidos. El bajo número de aspirados positivos impide comprobar un posible patrón estacional. La sintomatología asociada es inespecífica y característica de infecciones respiratorias de vías bajas.

## 431

### EVALUACIÓN DEL SISTEMA SEPTIFAST (SF) CON EXTRACCIÓN AUTOMÁTICA DEL ADN EN LA DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS PRODUCTORES DE SEPSIS EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS (UCI)

B. Puche<sup>1</sup>, A.I. Martos<sup>1</sup>, J.C. Palomares<sup>1,3</sup>, F. Lucena<sup>2</sup>, C. León<sup>2</sup> y E. Martín-Mazuelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UGC Microbiología, H.U. Virgen de Valme. <sup>2</sup>Unidad de Cuidados Intensivos. <sup>3</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla.

**Introducción/objetivo:** La instauración rápida de un tratamiento antimicrobiano adecuado en los pacientes crí-

ticos con sospecha de sepsis, es crucial para su supervivencia. En estos pacientes el tratamiento empírico suele ser incorrecto lo que prolonga su estancia en UCI y los costes derivados. Nuestro objetivo fue analizar el tiempo ganado en el diagnóstico e instauración del tratamiento específico, utilizando un método automático de extracción de ADN junto a un método comercial de PCR múltiple a tiempo real.

**Material y métodos:** Se estudiaron 43 muestras de sangre procedentes de 41 pacientes obtenidas simultáneamente a sendos hemocultivos (HC). La extracción del ADN se realizó con el procedimiento manual recomendado por el fabricante (Septifast Prep kit) y con un método automático (MagNAPure Compact). La PCR a tiempo real se realizó en el sistema LightCycler® Septifast kit (Roche Diagnostics). Los hemocultivos se realizaron en el sistema BACTEC® (Becton Dickinson).

**Resultados:** El tiempo empleado, con la extracción automática, en dar un resultado al clínico fue de 4 horas. En 27 pacientes, tanto el hemocultivo como la PCR fueron negativos, con una ganancia media de tiempo de tratamiento adecuado (TTA) de la PCR de 5 días. En 4 pacientes, se obtuvo un resultado positivo concordante en HC y SF (2 *S. aureus*, 1 *S. pneumoniae* y 1 *S. epidermidis*) con una ganancia media en TTA de 2,5 días (rango 1-4). En 7 pacientes, el resultado de SF fue positivo y el de HC negativo (2 *E. coli*, 2 *S. aureus*, 1 *A. fumigatus*, 1 *S. pneumoniae* y 1 *P. aeruginosa*) dando lugar al desescalado antibiótico en 5 de ellos, una adecuación específica y una instauración en paciente no tratado previamente. Finalmente en 3 pacientes el resultado de SF fue negativo y el HC positivo (1 *S. enteritidis*, 1 *P. aeruginosa* y 1 *E. coli*).

**Conclusiones:** El uso de SF con extracción automática en pacientes críticos, disminuye el TTA a 4 horas, lo que unido a una mayor sensibilidad respecto a los HC, permite la instauración precoz de un tratamiento antimicrobiano específico vital en estos pacientes.

## 432

### APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA NEUMONÍA EXTRAHOSPITALARIA

P. Mejuto, J.A. Boga, S. Melón, R. Cimadevilla, P. Alonso, R. Ortega y M. Álvarez

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

**Objetivos:** Diseño, optimización y simplificación de técnicas de amplificación genómica para la detección de *L. pneumophila*, *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* y aplicación en muestras de exudados faríngeos.

**Material y métodos:** Para cada microorganismo a estudio se diseñaron dos parejas de cebadores, dos protocolos de PCR simple (PCRs) y un de PCR "nested" (PCRs). Por último, se ensayó una PCR múltiple de todos ellos. La sensibilidad y especificidad de los distintos protocolos se determinó utilizando un cepario que contenía controles positivos y negativos; el límite de detección se estableció con diluciones seriadas de microorganismos control. Estos protocolos se aplicaron a 97 muestras faríngeas, de otros tantos pacientes, con muestras recogidas para determinaciones convencionales (cultivos, detección de antígenos en orina y determinación de anticuerpos) y con cuadros clínicos compatibles con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). En éstas, se purificó el genoma bacteriano mediante un sistema automático (Amplipred, Roche, USA).

**Resultados:** La especificidad de la PCRs y PCRs para los tres microorganismos a estudio fue del 100%. En cuanto a la sensibilidad, los límites de detección de los protocolos de PCRs superaron a sus homólogos PCRs: 10 y  $10^2$  copias/ $\mu$ l para *L. pneumophila*; y  $10^2$  y  $10^4$  copias/ $\mu$ l para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, respectivamente. De los 97 exudados

faríngeos, 36 (37,11%) fueron positivos: 10 *L. pneumophila*, 6 *M. pneumoniae*, 1 *C. pneumoniae*, 15 *S. pneumoniae*, 3 *S. pyogenes* y 1 *H. influenzae*; De éstos 5 (5,15%), lo fueron por serología: 1 *L. pneumophila*, 3 *M. pneumoniae* y 1 *C. pneumoniae* y 8 (9,63%) *L. pneumophila*, mediante determinación de antígenos en orina. La PCRn detectó 16 (16,49%): 10 *L. pneumophila* y 6 *M. pneumoniae*. En estas muestras, la PCR múltiple mostró una especificidad del 100% y detectó 14 de los 16 casos positivos que se obtuvieron mediante PCRn.

**Conclusiones:** La PCRn fue más sensible que las técnicas convencionales y supone una alternativa rápida, sensible y específica en el diagnóstico de microorganismos asociados con la NAC. Esta técnica logró aumentar el diagnóstico microbiológico de esta patología, en las muestras estudiadas. El protocolo de amplificación se puede simplificar utilizando una PCR múltiple.

## 433

### EFFECTIVIDAD DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN LA DETECCIÓN DEL FALLO VACUNAL SECUNDARIO EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA PAROTIDITIS

E. Royuela<sup>1,2</sup>, A. Castellanos<sup>1</sup>, M.E. Guisasola<sup>1</sup>, J.C. Sanz<sup>3</sup>, C. Sanchez-Herrero<sup>1,2</sup>, M. Mosquera<sup>1</sup>, F. De Ory Manchón<sup>1,2</sup> y J.E. Echevarría<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas en Red en Epidemiología y Salud Pública CIBERESP. <sup>3</sup>Laboratorio regional de Salud Pública. Instituto de Salud Pública de la Comunidad de Madrid.

**Introducción/objetivos:** La parotiditis es una enfermedad leve que ocasionalmente cursa con complicaciones más graves como meningitis, encefalitis y orquitis. La vacunación masiva redujo enormemente los casos de parotiditis, aunque actualmente, se están produciendo brotes en población vacunada de todo el mundo. Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de paperas por el virus de la parotiditis (MVs) consisten en su aislamiento en muestras clínicas o detección de seroconversión (o un aumento significativo del título de IgG en el suero) o detección de anticuerpos tipo IgM. Estas recomendaciones no incluyen los métodos de detección molecular mediante RT-PCR, siendo éstos habitualmente utilizados en los laboratorios de referencia. Por ello, en este trabajo, nuestro objetivo ha sido evaluar la efectividad de los marcadores moleculares en el diagnóstico de la parotiditis por MVs para evaluar un posible fallo vacunal secundario.

**Métodos:** Se han analizado muestras de suero y saliva y/u orina de 593 casos pertenecientes a una cohorte de individuos para la detección de RNA de MVs mediante una nested RT-PCR que amplifica un fragmento de 112 pares de bases del gen de la nucleoproteína. También se utilizó la detección de IgG e IgM por ELISA indirecto (Enzygnost, Siemens).

**Resultados:** De los casos analizados, 296 (49,9%) resultaron positivos. De ellos, un 30,7% fueron positivos tanto a IgM como por RT-PCR, un 29,7% fueron positivos a IgM pero negativos por RT-PCR y un 39,5% resultó estar compuesto por casos negativos a IgM pero positivos por RT-PCR. El 97,4% de estos últimos fueron positivos a IgG sugiriendo ser consecuencia de reinfección debida a un fallo vacunal secundario.

**Conclusiones:** Los datos presentados en este estudio demuestran que los marcadores moleculares son imprescindibles tanto para el diagnóstico de la parotiditis por MVs como para la detección de un posible fallo vacunal secundario. Además, el porcentaje de positivos a IgM específica frente a MVs que resultaron negativos median-

te RT-PCR nos indica que debemos utilizar ambas técnicas de forma complementaria y que los métodos actuales de detección de RT-PCR han de ser revisados para obtener protocolos más sensibles. A su vez, sería recomendable tener en cuenta la titulación de IgG totales como marcador serológico para la infección por MVs, ya que como hemos observado, cuando los casos fueron negativos a IgM, casi el 100% de las muestras fueron IgG positivas.