

El paciente era un varón de 58 años que ingresó en abril de 2005 con fiebre y disnea de mínimo esfuerzo. Había sido diagnosticado de hepatopatía crónica alcohólica, no se conocía que presentara valvulopatía previa y no se encontraba bajo tratamiento antibiótico. En la exploración presentaba signos compatibles con sepsis e insuficiencia cardíaca congestiva con soplo de insuficiencia aórtica IV/VI. Se inició antibioterapia empírica con ampicilina (2 g/4 h) y gentamicina (80 mg/8 h) y se realizó un ecocardiograma transesofágico que mostró una vegetación aórtica de 0,6 cm e insuficiencia aórtica grave. Los cuatro hemocultivos extraídos al ingreso fueron estériles. El paciente, que al sexto día presentó un cuadro compatible con embolia cerebral en el territorio de la arteria cerebral media izquierda, fue intervenido quirúrgicamente con sustitución valvular aórtica mediante prótesis biológica. El paciente completó 6 semanas de terapia antibiótica intravenosa con ceftriaxona (2 g/24 h). Fue dado de alta en situación clínica estable pero falleció 2 meses después por un cuadro de hemorragia cerebral no relacionada con la EI.

La válvula y la vegetación fueron enviadas al laboratorio de microbiología para su estudio microbiológico y los cultivos de ambas muestras resultaron negativos. Ante esta situación, se realizó la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN extraído del material valvular (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN). Se amplificó el gen que codifica el ARNr 16S bacteriano (PCR universal) utilizando iniciadores previamente descritos⁴, y el producto obtenido (aproximadamente 1.500 pb) se envió para la secuenciación automática de ambas cadenas con los iniciadores empleados en la amplificación y dos iniciadores internos⁴. Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en la base de datos GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la alineación correspondió, con un 100% de identidad, con *S. agalactiae*.

La identificación bacteriana mediante la PCR universal a partir de muestras clínicas consiste en la amplificación del gen *rrs* (o los genes *rrs*, ya que la mayoría de las bacterias tienen varias copias de dicho gen) que codifica el ARNr 16S que forma parte de la subunidad menor (30 S) del ribosoma bacteriano^{5,6}. El ADN que se utiliza como molde en la reacción de amplificación es extraído directamente de la muestra, utilizando, en la mayoría de los casos, equipos comerciales. En la PCR pueden utilizarse diferentes iniciadores (*primers*) que por tanto per-

mitirán, según el caso, la amplificación de diferentes regiones del gen *rrs* y la obtención de segmentos génicos (amplicones) de diferente tamaño. Generalmente se utilizan iniciadores que permiten la amplificación de un fragmento de unos 500 pb del extremo 5' del gen en el que se encuentra la mayor variabilidad y cuya secuencia aporta una adecuada información filogenética⁶. Una vez purificado el correspondiente amplicón, se determina su secuencia genética. La secuencia obtenida se compara, utilizando un programa informático, con aquellas depositadas en las bases de datos (bancos de secuencias) que existen en internet (EMBL, GenBank, RIDOM). Según el grado de homología entre la secuencia incógnita y aquella de la base de datos se puede establecer la identidad del microorganismo en estudio. En casos de EI, la identificación bacteriana empleando la PCR universal presenta una sensibilidad igual a la del hemocultivo en caso de microorganismos sin problemas de crecimiento y superior al cultivo valvular, particularmente si el paciente está recibiendo o ha sido sometido a tratamiento antibiótico^{5,7,8}. De hecho, se ha propuesto que la PCR universal sea incluida como criterio mayor en los criterios diagnósticos de Duke para la EI^{9,10}.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este caso, *S. agalactiae*, un agente etiológico poco frecuente de EI, podría ser identificado mediante PCR universal en aquellos casos que cursan con cultivos convencionales negativos.

María Isabel Morosini^a,
Laura Hurtado-Carrillo^b,
Mario Rodríguez-Domínguez^a
y Pilar Martín-Dávila^b

Servicios de ^aMicrobiología
y ^bEnfermedades Infecciosas.
Hospital Universitario Ramón
y Cajal. Madrid. España.

Bibliografía

- Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. Lancet. 2004;363:139-49.
- Sambola A, Miró JM, Tornos JM, Almirante B, Moreno-Torrico A, Gurgui M, et al. *Streptococcus agalactiae* infective endocarditis: Analysis of 30 cases and review of the literature, 1962-1998. Clin Infect Dis. 2002;34:1576-84.
- Rollán MJ, San Román JA, Vilacosta I, Sarriá C, López J, Acuña M, et al. Clinical profile of *Streptococcus agalactiae* native valve endocarditis. Am Heart J. 2003;146:1095-8.
- Gürtler V, Stanisch VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology. 1996;142:3-16.

- Marín M. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico de la endocarditis infecciosa. En: Picazo JJ, Bouza E, editores. Infección. Bilbao: Servisistem 2000; 2004. p. 11-25.
- Rodicio M, Mendoza M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22:238-45.
- Breitkopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. Circulation. 2005;111:1415-21.
- Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Ruef C, Böttger C, Altwegg M. Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. Clin Infect Dis. 2003;37:167-72.
- Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis - A new Duke's criterion. Scand J Infect Dis. 2001;33:673-80.
- Tak T, Shukla SK. Molecular diagnosis of infective endocarditis: a helpful addition to the Duke criteria. Clin Med Res. 2004;284:206-8.

Síndrome linfocutáneo por *Nocardia brasiliensis* en una paciente inmunocompetente

Sr. Editor: La nocardiosis es una infección producida por especies del género *Nocardia* que puede ser localizada o diseminada. Son bacterias aerobias, grampositivas, parcialmente ácido-alcohol resistentes, que originan formas filamentosas y/o ramificadas, y que puede fragmentarse en elementos cocobacilares muy pleomórficos. Las bacterias del género *Nocardia* se encuentran generalmente en el suelo y en la materia orgánica en descomposición. Se han detectado especies patógenas de *Nocardia* (*N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidis* ssp. *caviarum*) en el polvo, en arena de playa y en piscinas. Además, *N. asteroides* forma parte de la flora habitual de la cavidad oral y el tracto respiratorio superior¹. Existen dos formas clínicas de presentación: la sistémica y la cutánea. La forma sistémica producida por *N. asteroides* en pacientes inmunodeprimidos produce infección pulmonar con diseminación frecuente al tejido celular subcutáneo y al sistema nervioso central. Las formas cutáneas localizadas y de partes blandas son poco frecuentes (sólo representan el 5% del total) y son causadas habitualmente por *N. brasiliensis*². Suele haber una historia previa de inoculación traumática directa a través de heridas superficiales con potencial contaminación con materia orgánica. Los casos de nocardiosis por *N. brasiliensis* descritos han sido fundamentalmente en zonas tropicales. En España la nocardiosis

cutánea ha sido atribuida habitualmente a *N. asteroides*^{3,4}. Presentamos el caso de una paciente inmunocompetente a la que asistimos y diagnosticamos síndrome linfocutáneo por *N. brasiliensis*.

Se trata de una mujer de 49 años, natural de Bélgica, que residía en España desde hacía 7 años. Como único antecedente refería hipertensión arterial en tratamiento con valsartán. Fue remitida a la consulta de enfermedades infecciosas porque presentaba desde hacía 2 semanas una lesión eritematosa en el cuarto dedo de la mano derecha que apareció tras haber estado trabajando en su jardín. No recordaba ninguna rozadura o traumatismo previo. La lesión se extendía hacia la zona anterior del antebrazo y se acompañaba de dolor intenso y supuración (fig. 1), y de adenopatías en la región axilar izquierda. No presentaba fiebre ni otra sintomatología asociada. La analítica ordinaria no mostró alteraciones.

Se desbridó la zona y se tomaron muestras que se procesaron para tinción de Gram y cultivo microbiológico. Se inició tratamiento con amoxicilina-ácido clavulánico. Tras 4 días de tratamiento antibiótico, la lesión se abscesificó y precisó un nuevo desbridamiento quirúrgico. A los 5 días de incubación, en las placas de agar sangre se observaron unas colonias blancas adheridas al agar, rugosas y con una superficie aterciopelada, correspondientes a formas bacterianas filamentosas, ramificadas y parcialmente ácido-alcohol resistentes tras la tinción modificada de Ziehl-Neelsen. El conjunto de las características morfológicas, macroscópicas y microscópicas permitieron la identificación del aislado como *Nocardia*. La cepa se remitió al Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Valencia para la determinación de la especie. Las pruebas metabólicas fueron compatibles con *N. brasiliensis* y la identidad de la especie fue confirmada mediante secuenciación. Se inició, por tanto, tratamiento con trimetoprim/sulfametoxazol a dosis de 5 mg/kg/día (trimetoprim) por vía oral durante 6 semanas. La evolución fue buena, con desaparición completa de las lesiones. No se observaron recurrencias durante un período de seguimiento de 5 meses.

La presentación clínica de este caso es característica de un síndrome linfocutáneo que resultó deberse a *N. brasiliensis*. Aunque *N. brasiliensis* es la especie que con más frecuencia provoca infecciones cutáneas en países tropicales, en nuestro entorno parece un proceso excepcional. En España únicamente hemos encontrado publicado en la bibliografía médica un



Figura 1. Lesión eritematosa en cuarto dedo de mano derecha con extensión linfática al dorso.

caso de infección por *N. brasiliensis* en una paciente inmunocompetente con una mastitis, que, al igual que nuestro caso, precisó desbridamiento quirúrgico y un tratamiento antibiótico prolongado⁵.

La localización más habitual de las infecciones cutáneas producidas por *Nocardia* spp. es en las extremidades superiores e inferiores, y la inoculación se produce generalmente tras una herida abrasiva o punzante contaminada, aunque también puede aparecer después de una picadura de insecto o mordedura de animales. En el caso descrito, la lesión primaria estaba situada en el cuarto dedo de la mano derecha con extensión linfática hasta el dorso de la mano y el antebrazo, y la inoculación probablemente sucedió de forma accidental mientras trabajaba en su jardín.

El síndrome linfocutáneo puede estar producido por una amplia variedad de patógenos. Los microorganismos más habituales en nuestro entorno son *Sporothrix schenckii* y *Mycobacterium marinum*, pero también pueden producirlo otras micobacterias, así como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Leishmania* spp., *Scedosporium apiospermum* y algunos virus⁶. El caso presentado nos recuerda que *N. brasiliensis* también debe ser evocado como agente causal en nuestro medio. El antecedente de herida traumática contaminada con suciedad y un período de incubación relativamente corto (menos de 2 semanas) debe orientar a nocardiosis. Dada la diversidad de microorganismos que pueden producir síndrome linfocutáneo, el diagnóstico microbiológico es fundamental para seleccionar la terapéutica más adecuada. En el caso de la nocardiosis, el aislamiento del microorganismo no suele ser difícil si se obtienen muestras adecuadas. Las características del cultivo y la morfología microscópica generalmente permiten la identificación del género *Nocardia*. La determinación de la especie no suele estar al alcance del laboratorio clínico convencional, por lo que requiere la realización de pruebas bioquímicas específicas y/o técnicas moleculares para

su confirmación⁷. En el caso presentado, la confirmación de la especie se llevó a cabo mediante secuenciación. El tratamiento de elección de las infecciones por *Nocardia* spp. es la combinación de trimetoprim-sulfametoxazol durante 6-16 semanas, aunque se han comunicado curaciones con sólo 4 semanas de tratamiento⁸. En pacientes con intolerancia a las sulfamidas se ha recomendado utilizar tetraciclinas, amikacina o amoxicilina-ácido clavulánico. En nuestra paciente, la cepa era sensible *in vitro* a amoxicilina-ácido clavulánico, pero no se obtuvo una buena respuesta clínica con este fármaco.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Borrás, del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico de Valencia, por su colaboración en la identificación del aislamiento.

Enrique Bernal^a, Nadia Ahmad^a,
Pilar López^b y Félix Gutiérrez^a

^aUnidad de Enfermedades Infecciosas.

^bServicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. España.

Bibliografía

1. Kannon GA, Kuechle MK, Garrett AB. Superficial cutaneous *Nocardia asteroides* infection in an immunocompetent pregnant woman. *J Am Acad Dermatol*. 1996;35:1000-2.
2. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7:357-417.
3. Comellas J, Morales M, Granell F. Nodular lymphangitis caused by *Nocardia asteroides*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18:385-8.
4. Pintado V, Gómez-Mampaso E, Fortún J, Meseguer MA, Cobo J, Navas E, et al. Infection with *Nocardia* species: clinical spectrum of disease and species distribution in Madrid, Spain, 1978-2001. *Infection*. 2002;30:338-40.
5. Navarro V, Salavert M. Mastitis causada por *Nocardia brasiliensis* en un paciente inmunocompetente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1997;15:339-40.
6. Smego RA, Jr., Castiglia M, Asperilla MO. Lymphocutaneous syndrome. A review of non-sporothrix causes. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78:38-63.
7. Kiska DL, Hicks K, Pettit DJ. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an

- abbreviated battery of tests. J Clin Microbiol. 2002;40:1346-51.
8. Georgiou PR, Blacklock ZM. Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. Med J Aust. 1992;156: 692-7.

Caracterización de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* con alta resistencia a fluoroquinolonas aisladas en Vizcaya

Sr. Editor: En la actualidad, la alta prevalencia de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a fluoroquinolonas (NGRQ) constituye un problema en muchos países, con gran repercusión en el tratamiento de elección de la gonorrea¹. En nuestro hospital, desde su aparición en 2004, todas las NGRQ aisladas han presentado resistencia de alto nivel (concentración inhibitoria mínima [CIM] ≥ 4 μ g/ml). El objetivo del presente estudio fue determinar los mecanismos moleculares presentes en estas cepas, y establecer la relación genética entre ellas mediante electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE).

Se analizaron 24 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas consecutivamente en el período 2004-2005 en 22 varones con uretritis y 2 mujeres, una con cervicitis y otra con enfermedad inflamatoria pélvica (EIP). Se obtuvo información en el momento de la consulta sobre edad, sexo, hábitos sexuales y lugar de adquisición de la infección. La determinación de la CIM a ciprofloxacino, penicilina y tetraciclina se realizó mediante Etest (Biodisk, Solna, Suecia) en medio GC agar base suplementado (BioMérieux, Francia). Se utilizó *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 como cepa control. Se identificaron las mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB* y *parC* de 8 NGRQ y 6 cepas sensibles mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de los productos amplificados que incluían las regiones QRDR. El ADN genómico de todas las cepas resistentes se exa-

minó por PFGE tras digestión con la endonucleasa *SpeI*. Las similitudes de los patrones de bandas se estimaron mediante el coeficiente de Dice y se analizaron usando el programa Molecular Analyst Fingerprinting (Image Analysis System, Bio-Rad).

En nuestro hospital, la primera NGRQ (cepa 1) se aisló en 2004. El aislado procedía de un paciente con uretritis adquirida en Rumanía, con una CIM de 16 μ g/ml. Durante el período 2004-2005 se aislaron 24 cepas de gonococo, 8 de las cuales (33%) presentaban resistencia de alto nivel a ciprofloxacino (CIM ≥ 4 μ g/ml). No se aisló ninguna cepa con resistencia intermedia. La sensibilidad de estas cepas a la penicilina y la tetraciclina se muestran en la tabla 1. Todos los pacientes eran heterosexuales, con edades comprendidas entre los 22 y los 56 años. Dos pacientes (cepas 2 y 6) habían sido tratados días antes con ciprofloxacino, sin responder al tratamiento. El análisis molecular mostró diferentes patrones de mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* en las 8 cepas resistentes a ciprofloxacino, si bien todas ellas contenían de forma constante mutaciones en los codones Ser91 y Asp95 en *gyrA*. En *parC* las mutaciones afectaron a Asp86 o Ser87. Ninguna de las cepas estudiadas presentó mutaciones en *gyrB*. El análisis de los patrones obtenidos por PFGE mostró seis patrones de bandas distintos (tabla 1). Sin embargo, tres de estos perfiles (P1, P2 y P3) presentaban una homología de un 85% entre sí y podrían ser considerados variaciones subclonales dentro de un mismo genotipo. Estas cepas fueron aisladas de pacientes que habían adquirido la infección en Vizcaya. Dos cepas mostraron un patrón distinto a los anteriores (P4) y fueron adquiridas también en nuestra provincia. Los patrones P5 y P6 correspondieron a dos cepas adquiridas en Rumanía (caso 1) y Almería (caso 2). No se ha encontrado relación entre los patrones de muta-

ciones y los patrones genéticos obtenidos por PFGE.

El alto porcentaje de resistencia a quinolonas en nuestro ámbito, al igual que en el resto de Europa², ha obligado a modificar las recomendaciones para el tratamiento empírico de la infección gonocócica^{3,4}. La aparición de NGRQ y su brusco aumento en nuestro hospital (del 64% en la actualidad) nos hizo pensar en que se estuviera expandiendo una variante resistente. El análisis molecular de estas cepas ha mostrado mutaciones conjuntas en *gyrA* y *parC*. Diferentes trabajos han correlacionado el nivel de resistencia de los gonococos a quinolonas y el número y localización de las mutaciones en la QRDR de los genes *gyrA* y *parC*. Generalmente, las mutaciones en *gyrA* son necesarias para el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas, y la presencia simultánea de una o más mutaciones en *parC* aumentan el nivel de resistencia⁵⁻⁷. El estudio genético de las cepas por PFGE, junto al estudio epidemiológico, indicó una diversidad en los patrones encontrados. Los perfiles P1, P2 y P3, que podrían ser considerados variaciones subclonales dentro de un mismo genotipo, sin embargo presentan distintas mutaciones en el QRDR. La caracterización molecular de estos aislamientos muestra una considerable diversidad entre las NGRQ aisladas. Estos resultados parecen indicar que el rápido aumento en la prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas en nuestra área no se debe a la expansión endémica de una o dos cepas, sino a la diseminación multiclonal de variantes resistentes de cepas locales e importadas. El escaso número de casos de nuestro trabajo limita la extrapolación de los resultados, pero la caracterización molecular de NGRQ es una importante herramienta para el estudio de los posibles patrones de diseminación. La alta prevalencia de gonococos con resistencia a antibióticos constituye un creciente problema sa-

TABLA 1. Sensibilidad y caracterización molecular de las cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a fluoroquinolonas

Cepa	Patrón PFGE	CIM (μ g/ml)			<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		<i>parC</i> silente	
		CIP	PEN	TE	Ser 91 (TCC)	Asp95 (GAC)	Asp86 (GAC)	Ser87 (AGT)	Tyr104 (TAT)	Leu131 (CTC)
1	P5	16	0,75	3	Phe (TTC)	Gly (GGC)	Asn (AAC)			Leu (CTG)
2	P6	16	0,5	2	Phe (TTC)	Gly (GGC)		Arg (CGT)	Tyr (TAC)	Leu (CTG)
3	P4	> 32	2	4	Phe (TTC)	Gly (GGC)	Asn (AAC)			Leu (CTG)
4	P1	4	0,25	1	Phe (TTC)	Ala (GCC)		Asn (AAT)		Leu (CTG)
5	P1	16	0,38	3	Phe (TTC)	Gly (GGC)	Asn (AAC)			Leu (CTG)
6	P2	8	2	1,5	Phe (TTC)	Gly (GGC)		Arg (CGT)	Tyr (TAC)	Leu (CTG)
7	P4	8	2	1	Phe (TTC)	Gly (GGC)		Arg (CGT)	Tyr (TAC)	Leu (CTG)
8	P3	16	1	2	Phe (TTC)	Gly (GGC)	—	Arg (CGT)	Tyr (TAC)	Leu (CTG)
9-14	—	$\leq 0,004$	0,06-0,5	0,5-1	—	—	—	—	—	Leu (CTG)

CIM: concentración inhibitoria mínima; CIP: Ciprofloxacino; P1, P2, P3, P4, P5, P6: patrones obtenidos por PFGE tras digestión con *SpeI*; PEN: penicilina; PFGE: electroforesis en gel de campos pulsantes; TE: tetraciclina.