

6. Monod M, Jaccoud S, Zaugg C, Lechéne B, Baudraz F, Panizzon R. Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area (Switzerland). *Dermatology*. 2002;205:201-3.
7. Gilaberte Y et al. Tinea capitis in infants in their first year of life. *Br J Dermatol*. 2004;151:886-90.
8. Segundo C, Martínez A, Arenas R, Fernández R, Cervantes RA. Dermatocosis por *Microsporum canis* en humanos y animales. *Rev Iberoam Micol* 2004;21:39-41.

Evaluation of Cobas Ampliprep Automated Nucleic Acid Extraction for Genotyping Human Papillomavirus (HPV) by the Roche linear array HPV Test

To the Editor: Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most common sexually transmitted diseases. Certain HPV genotypes, the so-called high-risk genotypes (HR), have an established role in cervical carcinogenesis. Detection of HR genotypes in cervical samples is an important measure for preventing cancer of the cervix and, together with Papanicolaou smears, is the cornerstone of cervical cancer screening. Currently, two useful assays are available for detecting HPV in cervical samples, hybrid capture (HC) and polymerase chain reaction (PCR). PCR has several advantages over HC, but also some problems; mainly, the test is time-consuming, experience in molecular assays is needed, and cross-contamination is common. A validated, reliable, fast, easy to perform, semi- or fully-automated assay would be desirable for HPV detection and genotyping, particularly in laboratories that handle a large number of samples. Genotyping methods are important for improving our understanding of the progression of infection to cervical cancer, since individual risk stratification, the prevalence and persistence of infection, and the onset of new infections can be determined by genotyping¹. The development of HPV vaccine also depends on typing².

Stevens et al recently described an automated extraction system, Roche MagNA Pure LC, as an alternative method for specimen processing before using the linear array HPV test (LA) for detecting and genotyping HPV³. The authors recommend the use and validation of automated nucleic acid purification platforms to simplify the assay's extraction step. The Cobas AmpliPrep (CA) (Roche Diagnostics, S.L., Barcelona, Spain) instrument is used for quantification of hepatitis B, hepatitis C, HIV, CMV and other viruses in clinical samples in many clinical microbiology labora-

tories. Our study sought to compare automated HPV nucleic acid extraction by the CA with the manual AmpliLute (MA) (Roche Diagnostics, S.L., Barcelona, Spain) protocol, a commercially available liquid media extraction kit.

DNA was extracted from 100 cervical brush samples (in PreservCyt medium) and isolated using two different procedures: 1) a 250 µl aliquot was extracted with the AmpliLute Liquid Media Extraction (EXTRN) kit according to the manufacturer's instructions; and 2) a 800 µl aliquot added to 250 µl ATL (EXTRN kit) was extracted using the automatic nucleic acid extraction method of the CA, using a procedure that involved modification of the CS3 cassette of the Total Nucleic Acid Isolation (TNAI) kit (Roche Diagnostics, S.L., Barcelona, Spain). AVE buffer (EXTRN kit) was used instead of elution buffer in the TNAI EB bottle and CAR (EXTRN kit) and diluent were added to the empty GPV vial. Then, all samples were analyzed by LA assay for HPV genotyping by automated system using the recommended protocol, except that a 100-µl aliquot of the CA denatured amplicons was used. The staff carrying out the study had not been specifically trained in molecular techniques. One positive and one negative control were processed with each run of up to 22 specimens. The internal control included in the kit was β-globin. An additional primer pair targets the human β-globin gene, which was isolated concurrently. All 100 samples analyzed generated positive high and low β-globin results (two visible bands for each strip) using the two protocols, thus demonstrating adequate specimen integrity, DNA extraction, and amplification⁴.

High-risk HPV types were detected by both manual and automated protocols in 45/100 cervical samples; 48/100 samples tested negative, a nearly perfect concordance level ($\kappa = 0.86 \pm 0.09$). Manual AmpliLute detected six additional HR-HPV-positive samples (2 HPV-16, 2 HPV-31, 1 HPV-45, and 1 HPV-68) and CA revealed one additional positive result (HPV-51). An alternative test, Hybrid Capture II (HC2) (Digene, Gaithersburg, USA), was used to analyze discrepant samples. Four HR-HPV were negative and three positive, one of them with low signal intensity. Table 1 lists the results of these 7 discrepant samples with all the methods used (MA, CA and HC2), as well as the cytology data⁵. Some cross-contamination cannot be ruled out in the MA results. In fact, cross-contamination was not unexpected considering the manner in

which the manual method is performed. Our data show that for detecting HR-HPV in cytology specimens with borderline changes, MA detected slightly more cases and reached a higher analytic sensitivity than CA. Both tests performed similarly with respect to identification of HPV in high-grade disease.

In practical terms, several molecular methods have been described for identifying type-specific HPV genotypes⁵. Although PCR-based assays have not yet been approved by the U.S. Food and Drug Administration for clinical use, they provide a rapid means of HPV detection and genotyping in clinical practice. The LA HPV genotyping test is a standardized, consistent, rapid method for detecting and typing up to 37 HPV mucosal genotypes⁶. Nevertheless, MA can be time-consuming and labor-intensive in clinical settings where many cervical samples are processed. In this context, and based on our data, we propose to replace the manual extraction step by the automated method evaluated in our study. This method provides several advantages and, in agreement with Stevens' results³, the two extraction methods demonstrated only slight differences in the outcome, although a small number of samples were analyzed and larger studies would be desirable. The use of an automated system for DNA isolation would greatly improve simplicity, time and labor efficiency, and reduce potential sample cross-contaminations, thus allowing many cervical samples to be processed simultaneously for cervical cancer screening.

Ana Fernández-Olmos,
Jesús Chacón, María Luisa Mateos
y Fernando Baquero
Servicio de Microbiología.
Hospital Universitario Ramón y Cajal.
Madrid. Spain.

TABLE 1. High-risk HPV detection by AmpliLute (MA), COBAS AmpliPrep (CA), Hybrid Capture II (HC2) and cytology⁶ in discordant samples

Patient	MA	CA	HC2	Cytology
1	45	N	N	L-SIL
2	31	N	N	L-SIL
3	68	N	HR*	L-SIL
4	16	N	N	ASCUS
5	31*	N	N	ASCUS
6	16*	N	HR	ASCUS
7	N	51	HR	L-SIL

*Weak signal. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; L-SIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; HR: high-risk HPV; N: negative.

References

- Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, et al. Distribution of human papillomavirus type 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res.* 2003;63:7215-30.
- Crum CP, Rivera MN. Vaccines for cervical cancer. *Cancer J.* 2003;9:368-76.
- Stevens MP, Rudland E, Garland SM, Tabrizi SN. Assessment of MagNA pure LC extraction system for detection of human papillomavirus (HPV) DNA in PreservCyt samples by the Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY HPV tests. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2428-33.
- Van Ham MA, Bakkers JM, Harbers GK, Quint WG, Massuger LF, Melchers WJ. Comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the Roche AMPLICOR HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2662-7.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002;287:2114-9.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32:S43-51.

Kingella kingae: condiciones determinantes del crecimiento en botella de hemocultivo

Sr. Editor: *Kingella kingae* es el microorganismo más frecuentemente implicado en infecciones osteoarticulares en pacientes de entre 6 meses y 2 años de edad¹⁻³. La mayoría de aislamientos se realizan mediante el cultivo de muestras de líquido articular y pus o tejido óseo del foco de osteomielitis en botellas de hemocultivo, ya que los métodos convencionales de cultivo habitualmente son ineficaces⁴⁻⁶. El presente estudio analiza la capacidad de crecimiento de *K. kingae* según las características de la botella de hemocultivo, la concentración del microorganismo y la presencia de sangre como suplemento nutritivo. Hay que tener presente que al realizar un hemocultivo, la sangre del propio paciente proporciona elementos nutricionales complementarios al medio de cultivo, circunstancia que no se produce cuando utilizamos este tipo de botellas para el cultivo de otro tipo de muestras clínicas.

Se han estudiado 12 cepas de *K. kingae*. A partir de una suspensión en suero fisiológico 0.5 McFarland se realizaron diluciones sucesivas denominadas A, B, C, D, E, F, con una concentración bacteriana aproximada de 10⁸, 10⁴, 10³, 10², 10 y 1 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, respectivamente. Se realizaron controles de crecimiento/con-

TABLA 1. Número de cepas aisladas y rango de tiempo de detección de crecimiento para cada dilución

Tipo de cultivo	Diluciones	A	B	C	D	E	F
SA + S	Concentración inóculo*	— ****	—	644	72	8	0-1
	Nº de cepas**	12	12	12	12	12	5
	Tiempo***	9-11	13-17	17-24	19-28	21-32	24-38
SA	Nº de cepas	10	7	2	5	1	2
	Tiempo	17-122	26-110	33-58	34-142	67-	106-161
PF + S	Nº de cepas	12	11	9	9	7	2
	Tiempo	10-39	16-62	23-48	28-42	31-58	38-41
PF	Nº de cepas	10	9	4	4	1	1
	Tiempo	13-62	25-113	43-74	41-55	120-	38-

SA: Botella de hemocultivo standard (formato pacientes adultos).

PF: Botella de hemocultivo con carbón activado (formato pacientes pediátricos).

+S: Suplemento de sangre añadido.

*Media de concentración del inóculo de cada dilución en ufc/0,4 ml, obtenida por siembra cuantitativa en placa de agar.

**Número de cepas aisladas en cada inóculo.

***Rango de tiempo, en horas, de detección de crecimiento en el sistema BacT/Alert.

****Incontable.

centración de las diluciones y se inocularon 0,4 ml de cada una en dos botellas BacT/Alert SA y dos botellas BacT/Alert PF (con carbón activado). En una botella de cada tipo se añadió 1 ml de sangre humana estéril. Las botellas se incubaron en el procesador automático BacT/Alert (BioMérieux).

La tabla 1 resume la capacidad de aislamiento de las cuatro modalidades de cultivo.

De los dos tipos de botellas utilizadas en este estudio, *K. kingae* mostró mayor capacidad de crecimiento y necesitó menos tiempo de incubación en las botellas SA + S (con suplemento de sangre). De hecho, se obtuvo crecimiento en todas las botellas hasta la suspensión E, y en la dilución F se obtuvo crecimiento en cinco cepas, que correspondía con la probabilidad teórica de inocular alguna bacteria. Por tanto, la capacidad de aislamiento de *K. kingae* en estas condiciones fue del 100%. La secuencia de tiempo de detección mantenía constante relación con la concentración del inóculo bacteriano y el rango de tiempo de detección de crecimiento para cada suspensión era muy estrecho, demostrando una gran homogeneidad en el crecimiento de todas las cepas. En las botellas PF con suplemento de sangre (PF + S) decreció la capacidad de aislamiento bacteriano al disminuir la concentración del inóculo y aumentó el tiempo de incubación para detectar el crecimiento. En las botellas SA y PF (sin suplemento de sangre), disminuye de forma importante la capacidad de aislamiento; en algunas cepas no se obtuvo crecimiento en ninguna dilución. Además, se observó discontinuidad de crecimiento en la secuencia de diluciones de diversas cepas.

En pediatría, entre uno y dos tercios de los casos con diagnóstico clínico de artritis u osteomielitis no se consiguen

aislar el microorganismo responsable^{7,8}. La reciente aplicación clínica de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica¹ ha confirmado que, en los casos compatibles con el patrón habitual de la infección por *K. kingae*^{2,3}, su implicación etiológica es superior a los casos confirmados por cultivo.

El escaso número de colonias obtenidas en los casos en que *K. kingae* se aisló a partir de siembra directa de la muestra en agar sangre⁹. La ineficacia de la tinción de Gram y las cuantificaciones realizadas directamente de muestras clínicas sugieren una baja concentración del microorganismo en el foco infeccioso³. Este dato es importante debido a que en nuestro estudio observamos que las diferencias más importantes en la capacidad de aislamiento se producían en inóculos con baja concentración bacteriana, y es en estas condiciones cuando la presencia de sangre y la ausencia de carbón activado es más determinante en el aislamiento del microorganismo. Por tanto, recomendamos la utilización de este método en botellas BacT/Alert SA¹⁰, aunque serían necesarios estudios realizados a partir de muestras clínicas para confirmar su utilidad práctica.

Amadeu Gené Giralta^a,
Edgar Palacín Camacho^a,
Montserrat Sierra Soler^b
y Ramon Huguet Carol^c

^aServicio de Microbiología.

Hospital Sant Joan de Déu.

^bServicio de Microbiología.

Hospital de Barcelona (SCIAS).

^cServicio de Ortopedia y Traumatología.

Hospital Sant Joan de Déu.

Barcelona, España.

Bibliografía

- Chometon S, Benit Y, Chaker M, Boisset S, Ploton C, Bérard J, et al. Specific real-time polymerase chain reaction places *Kingella*