

## Sesión 26

### Métodos moleculares

# 540

#### PCR PARA DETECCIÓN DE *N. MENINGITIDIS* EN LCR

M. Alkorta, B. Vilar, I. Martínez y J.I. López

**Introducción:** En las meningitis meningocócicas (MM) diagnosticadas en nuestro laboratorio antes del 2003 teníamos una correlación entre los resultados del Gram y el cultivo. Salvo alguna excepción, la observación de cocos gram negativos en el Gram se correspondía con el cultivo positivo. Sin embargo el año 2003 y probablemente debido a la administración del antibiótico antes de la punción lumbar, observamos una disminución de los aislamientos con respecto a lo observado en el Gram. Presentamos los datos obtenidos tras la introducción de la PCR como técnica diagnóstica para las meningitis meningocócicas.

**Material y métodos.** Utilizamos para el cultivo y para el Gram los procedimientos microbiológicos habituales. El tipo de las cepas se hizo en el Centro Nacional de Microbiología- Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda). El LCR se congeló a  $-70^{\circ}$  hasta la realización de la PCR. Se realizó una PCR múltiple con amplificación simultánea de dos fragmentos de los genes *CtrA* y *CrgA*.

**Resultados:** Estudiamos 14 pacientes con MM (7 hombres y 7 mujeres; 5 muestras pediátricas y 9 muestras de adultos). El porcentaje de positividad del Gram fue del 69,2% (9/14) mientras que la del cultivo del LCR fue del 57,2% (8/14). De los seis casos en los que el cultivo fue negativo, tres tuvieron el Gram y la PCR positiva y se aisló el meningococo en el hemocultivo, dos tuvieron solo positiva la PCR y el Gram y un caso sólo tuvo positiva la PCR. Los dos tipos de *N.meningitidis* más frecuentemente aislados fueron B2a:P1,5 y el C2a:P1,5.

**Conclusiones:** En nuestros pacientes la PCR confirma el resultado del Gram y en un caso fue el único procedimiento diagnóstico. Aunque esta técnica no sustituye a los métodos microbiológicos tradicionales puede resultar muy útil para documentar los casos en los que en cultivo es negativo.

# 541

#### SECUENCIACIÓN DEL GEN *porB*: UNA AYUDA EN EL PROCESO DE CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NO TIPABLES DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*

R. Abad, M.J. Uría, R. Enriquez, B. Alcalá, C. Salcedo y J.A. Vázquez

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

**Introducción:** El serotipado de las cepas de *Neisseria meningitidis* se realiza en base a las proteínas de membrana de clase 2/3 (PorB2/PorB3) por ELISA, mediante un panel internacional de anticuerpos monoclonales (Acms). Sin embargo, el panel actual de serotipado es incompleto, ya que, entre un 20 y 60% de las cepas de *N. meningitidis* de serogrupo B y C resultan no tipables (NT).

El **objetivo** de este estudio es analizar el gen *porB*, que codifica para las proteínas de clase 2/3, en cepas NT, determinando la frecuencia de variables no descritas de dicho gen.

**Material y métodos:** Se ha llevado a cabo la secuenciación completa del gen *porB* (1.053 pb en el caso de *porB2* y 894 pb en el caso de *porB3*) en 52 cepas NT de *N. meningitidis*, de las cuales 45 eran de serogrupo B, 4 de serogrupo C y 3 de serogrupo Y.

**Resultados/Discusión:** Tras definir la secuencia alélica del gen *porB* observamos que 2 aislados presentan el alelo *porB2*

(que codifica para la proteína PorB2) y 50 el alelo *porB3* (que codifica para la proteína PorB3). Del total, 13 cepas presentan variantes alélicas que codifican para proteínas frente a las cuales existen Acms disponibles, pero que no se utilizan en nuestro laboratorio debido a la baja frecuencia de cepas circulantes en España expresando estas proteínas. Por tanto, éstas pasarían a tener un carácter tipable siendo 4 de serotipo 19, 2 de serotipo 8, 6 de serotipo 17 y 1 de serotipo 22. Entre las secuencias analizadas se han encontrado también 9 variantes alélicas nuevas que han sido incluidas en la base de datos accesible en Internet (<http://neisseria.org/nm/typing/porb/>). Se encontraron 3 variantes diferentes del gen que codifica para la proteína correspondiente al serotipo 4, 2 variantes del 15, y una variante de los serotipos 1, 19, 17 y 2a. El resto de variantes alélicas corresponderían a los serotipos 4(23) y 1(16) para los cuales si se utilizan Acms en nuestro laboratorio. Este hecho nos lleva a pensar si el carácter NT de estas cepas sería debido a un menor grado de expresión de dicha proteína, y con el fin de comprobarlo estamos realizando estudios de expresión de la proteína PorB en estos aislados.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la mayor parte de las cepas NT presentan alelos del gen *porB* bien típicos del serotipo 4 bien variantes del mismo. Este dato tiene gran importancia en la formulación de una vacuna basada en proteínas de tipo 3.

## 542

### ANÁLISIS DE LA DISPERSIÓN DE CEPAS DE MENINGOCOCO B:2a:P1.5, PROBABLEMENTE ORIGINADAS A PARTIR DE UN MECANISMO DE INTERCAMBIO CAPSULAR.

B. Alcalá\*, C. Salcedo\*, R. Abad\*, M.J. Uría\*, R. Enríquez\*, L. Gaztelorrutia\*\* y J.A. Vázquez\*

\*Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. \*\*Servicio de Microbiología. Hospital de Cruces. Bilbao.

En España, tras dos intervenciones con vacunas frente a meningococo perteneciente al serogrupo C realizadas en los años 1997 y 2000 respectivamente, se estableció un sistema de vigilancia con el fin de detectar posibles alteraciones en la expresión antigénica de las cepas existentes.

Durante el período 2000-2, el número de cepas C:2b:P1.2,5 (antigua cepa epidémica) descendió, aumentando la incidencia de la expresión C:2a:P1.5, alcanzando un porcentaje del 47,4% en 2002. Al mismo tiempo, aislados B:2a:P1.5 comenzaron a detectarse, surgiendo los primeros casos a finales del 2001. Durante este año, 5 cepas fueron enviadas desde Vizcaya y otras dos fueron aisladas en individuos que, viviendo en Cantabria, asistían a colegios localizados en Vizcaya. Las cepas se caracterizaron como B:2a:P1.5, y concretamente como P1.5-1,10-8 mediante secuenciación del gen *porA*. El estudio de las cepas por Multi Locus Sequence Typing (MLST) mostró una combinación alélica correspondiente al ST11 (ET-37) y el análisis del gen *fumC* identificó las cepas como variantes ET-15. El análisis mediante electroforesis in campo pulsado (PFGE) mostró un pulsotipo (PT1) característico para éstos aislados y además, fueron resistentes a sulfamida (S<sup>r</sup>), mostrando un alelo específico para el gen *dhps* (alelo 5). Desde entonces, 16 nuevas cepas con las mismas características fenotípicas y genotípicas han sido recibidas en el 2002 y otras 21 más durante el año 2003 afectando, en diferente grado, a un total de 8 Comunidades Autónomas (CCAA). Otras cepas con idéntica caracterización antigénica (B:2a:P1.5) han sido igualmente aisladas en otras ocasiones y en diferentes CCAA, sin embargo, su caracterización molecular no las relaciona con la cepa B:2a:P1.5, originalmente aislada en Vizcaya. Los datos obtenidos se compararon con los de 83 cepas C:2a:P1.5 y 2 C:2a:NST aisladas en el período 1999-2002. Todas las cepas C:2a pertenecieron al ST11,

mostraron PTs relacionados pero, con excepción de 4 aislados (que mostraron el alelo 5 para *dhps*), el resto fueron sensibles a sulfamidas.

**Conclusiones:** Un posible fenómeno de intercambio capsular a partir de una variante C:2a:P1.5, resistente a sulfamidas, puede ser la causa de la aparición de cepas B:2a:P1.5 con un importante potencial epidémico. Dichas cepas se encuentran actualmente en proceso de expansión, habiendo sido aisladas en un buen número de CCAA.

## 543

### PCR COMO HERRAMIENTA PARA LA DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA INTERMEDIA A PENICILINA G EN CEPAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS

R. Enríquez, B. Alcalá, C. Salcedo, R. Abad, M.J. Uría y J.A. Vázquez

Centro Nacional de microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid.

**Introducción:** La resistencia intermedia a penicilina (pen<sup>I</sup>) en las cepas de meningococo viene determinada por alteraciones en la proteína de unión a penicilina (PBP-2) codificada por el gen *penA*. El análisis de la secuencia de este gen en 24 cepas sensibles (pen<sup>S</sup>) y 60 cepas resistentes (pen<sup>I</sup>) a penicilina permitió identificar 5 sitios polimórficos presentes en todas las cepas pen<sup>I</sup>. También se observaron otros sitios polimórficos en el gen *penA* que no se correlacionaron con la resistencia intermedia a penicilina. Con estos datos diseñamos una PCR para discriminar el nivel de resistencia a penicilina en cepas de meningococo.

**Material y métodos:** Basándonos en la presencia de los polimorfismos observados, se diseñaron iniciadores para amplificar la región de los nucleótidos 1526 a 1714, correspondiente a los aminoácidos 509 a 572 exclusivamente en cepas pen<sup>S</sup>. Se realizó la PCR en 40 cepas pen<sup>I</sup> y 30 cepas pen<sup>S</sup>. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C 2', seguida de 35 ciclos de 95°C 15", 60°C 30" y 72°C 1' y una extensión final de 72°C 5'. Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

**Resultados:** Todas las cepas sensibles produjeron el fragmento esperado (de 189 pb). En contraste, el fragmento del gen *penA* no amplificó en ninguno de los aislados pen<sup>I</sup>.

**Conclusiones:** Se desarrolló con éxito un ensayo de PCR basado en la detección en un gel de agarosa para discriminar entre cepas de meningococo sensibles y con resistencia intermedia a penicilina, ofreciendo una opción de bajo coste. El segundo paso debería ser adaptar esta estrategia para la detección en muestras clínicas como LCR, sangre, etc., en aquellos casos sólo confirmados por PCR diagnóstica. Nuestros resultados preliminares muestran que similares condiciones de PCR podrían permitir también trabajar con muestras biológicas.

## 544

### RELACIÓN ENTRE VIRULENCIA DE ESCHERICHIA COLI EXTRAINTESTINAL Y RESISTENCIA A FLUOROQUINOLONAS

E. Moreno, M. Sabaté, A.M. Planes, I. Planells, G. Prats y A. Andreu

Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

**Objetivo:** Estudiar en cepas de *E. coli* productoras de infección extraintestinal, la relación existente entre el grado de virulencia y la resistencia a fluorocinolonas (FQ).

**Métodos:** 150 cepas de *E. coli*: 50 obtenidas en pacientes con pielonefritis y hemocultivo negativo, 50 en pacientes con

bacteremia de origen urinario y 50 en pacientes con bacteremia de otros orígenes. Tanto los grupos filogenéticos (GF): A, B1, B2 y D, como los genes de factores de virulencia (FV): *papA*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fimH*, *afa/draBC*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *cnf1*, *iutA*, *fyuA*, *kpsTII*, *ibeA*, *traT* y marcador de PAI I<sub>CFT073</sub>, se caracterizaron mediante PCR. Los antígenos O (AgO) más frecuentes en *E. coli* uropatógeno: O1, O2, O4, O6, O7, O18 y O83 se determinaron por aglutinación. La sensibilidad a las FQ se estudió mediante disco difusión.

**Resultados:** De las 150 cepas, 18 (12%) fueron resistentes a las FQ (10% pielonefritis, 16% bacteremia urinaria, 10% otras bacteremias). Las cepas FQ sensibles fueron significativamente más prevalentes en el GF B2 (67%) que las resistentes (33%) ( $P < 0,001, X^2$ ), mientras que las cepas FQ resistentes fueron más prevalentes en los GF A y B1 (39% y 11%) que las sensibles (7% y 5%) ( $< 0,001, X^2$ ). Las cepas de *E. coli* FQ sensibles presentaron mayor número de FV (7,6) que las resistentes (4,5) (U de Mann Whitney,  $P < 0,001$ ). Todos los FV estudiados excepto *iutA*, fueron más frecuentes en las cepas FQ sensibles y de forma significativa: *papGII*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *kpsTII*, *fyuA* y PAI I<sub>CFT073</sub> (F de Fisher,  $P < 0,05$ ). El 57% de los *E. coli* FQ sensibles pertenecían a los 7 serogrupos O estudiados, frente al 0% de los resistentes ( $P < 0,001, X^2$ ).

**Conclusiones:** Las cepas de *E. coli* sensibles a FQ presentan una distribución entre los GF significativamente distinta a las resistentes. Las cepas de *E. coli* FQ sensible presentan significativamente más FV que las resistentes. *E. coli* FQ sensibles pertenecen a serogrupos O distintos a los FQ resistentes. Todo ello sugiere que *E. coli* FQ resistentes provienen en gran parte de poblaciones filogenéticas distintas a los FQ sensibles. Las cepas de *E. coli* FQ resistentes podrían adquirirse "de nuevo" o estar presentes en la flora fecal de forma minoritaria, y ser causantes de infección cuando el huésped presente condiciones favorables para su desarrollo.

## 545

### RELACIÓN CLONAL ENTRE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTES DE INFECCIÓN URINARIA (IU) Y LAS POBLACIONES INTESTINALES DOMINANTES

A. Andreu, E. Moreno, T. Pérez, A. Acarin, M. Sabaté y G. Prats  
 Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona

**Introducción:** La colonización fecal por *E. coli* uropatógeno y su relación con las poblaciones comensales ha sido poco estudiada. El objetivo de este estudio es el de comparar las cepas de *E. coli* causantes de infección urinaria con los clones de *E. coli* dominantes en intestino.

**Métodos:** Se estudiaron catorce mujeres, 13 con IU baja, no complicada (8) o complicada (5) y 1 con pielonefritis recurrente. La media de edad fue 34,2 años (rango 21-64). Tanto la cepa causante de IU, como las 3 dominantes en muestra rectal (obtenida antes del tratamiento antibiótico) se caracterizaron mediante: biotipado y estudio del grupo filogenético (GF): A, B1, B2, D y de los genes de virulencia (FV): *papA*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fimH*, *afa/draBC*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *cnf1*, *fyuA*, *iutA*, *kpsTII*, *ibeA*, *traT*, marcador PAI I<sub>CFT073</sub>, mediante PCR. **Resultados:** Cuatro de las 14 mujeres presentaron en heces un único clon idéntico al causante de la IU (caso 3: B2-5FV; caso 5: A-4FV; caso 8: D-3FV; caso 14: D-3FV). En 3 mujeres la cepa de *E. coli* mayoritaria en intestino y también más virulenta produjo la IU (caso 1: B2-9FV; caso 11: B2-8FV; caso 13: B2-7FV). En 2 mujeres el clon causante de IU fue uno de los dominantes pero no el mayoritario (caso 4: A-4FV; caso 6: D-4FV), ninguna de ellas albergaba en su intestino *E. coli* B2. En las 5 mujeres restantes el *E. coli* causante de la IU no se encontró en la población intestinal (caso 2: B2-9FV; caso 7: B2-10FV; caso 9: B2-8FV, caso 12: D-4FV), en todas excepto en caso el 12, el uropatógeno fue un *E. coli* B2 más virulento que el contenido en heces. De los 14 *E. coli* uropatógenos: 8 pertenecían al GF B2 (media de 8 FV/cepa), 4 al D

(5,3 FV) y 2 al A (4 FV). De los 22 *E. coli* dominantes en muestras rectales: 8 pertenecían al GF B2 (6,3 FV/cepa), 8 al D (3,9 FV), 4 al A (2,5 FV) y 2 al B1 (2,5 FV).

**Conclusiones:** En el 64% de mujeres (9/14) el uropatógeno se encontró en heces como población dominante. En el 85% (12/14) el uropatógeno fue el clon más virulento de los contenidos en heces. *E. coli* del GF B2 fue el uropatógeno más frecuente (57,1%) y virulento y provocó IU tanto cuando estaba en intestino como población más virulenta y dominante, como cuando no estaba (probablemente se trataba de una población muy minoritaria) pero era una cepa B2 más virulenta que las poblaciones fecales B2 dominantes.

## 546

### *ESCHERICHIA COLI*: RELACIÓN ENTRE EL GRUPO FILOGENÉTICO Y LA PRESENCIA DE ISLAS DE PATOGENICIDAD (PAIs)

M. Sabaté, A. Andreu, E. Moreno, T. Pérez y G. Prats  
 Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

**Objetivos:** Establecer la relación entre los grupos filogenéticos (GF) de *E. coli*: potencialmente patógenos (B2 y D) y no patógenos (A y B1) y la presencia de bloques de ADN exógeno que contienen genes codificantes de factores de virulencia (PAIs).

**Métodos:** 143 cepas de *E. coli*, de diferentes procedencias, aisladas en humanos. Se identificó el GF mediante PCR triplex para detectar los genes *chuA*, *yja* y *tsp*; y la presencia de marcadores de las ocho PAIs descritas en cepas uropatógenas: PAI I, II, III y IV de *E. coli* 536; PAI I y II de *E. coli* J96; PAI I y II de *E. coli* CFT073, por PCR utilizando cebadores específicos.

**Resultados:** De las 143 cepas de *E. coli*, el 54,5% pertenecían al GF B2, el 21% al D, el 18,2% al A y el 6,3% al B1. De estas 143 cepas, el 77,7% albergaban PAIs: un 16,8% presentaba una PAI, un 18,2% dos PAIs, 18,2% tres, 3,5% cuatro, 6,3% cinco, 13,3% seis y 1,4% siete PAIs. Del total de 347 PAIs detectadas, el 75,5% correspondía a la PAI IV<sub>536</sub>, 61,5% PAI I<sub>CFT073</sub>, 39,9% PAI II<sub>CFT073</sub>, 25,9% PAI II<sub>J96</sub>, 25,2% PAI I<sub>536</sub>, 16,1% PAI II<sub>536</sub> y 1,4% PAI III<sub>536</sub>. No se detectó PAI I<sub>J96</sub>. El GF B2 era el que presentaba mayor frecuencia de PAIs (46,8%), seguido de los GF A y D (13,3%) y finalmente del GF B1 (4,2%). Los GF B1 y D se asociaron significativamente con cepas que contenían únicamente una PAI; el GF A con cepas con 3 PAIs y el GF B2 con cepas con 4 y 6 PAIs, y también aunque en menor grado, con cepas con 5 y 7 PAIs ( $p \leq 0,05$ ). Se observó asociaciones positivas entre el GF B2 y las PAI I y IV de *E. coli* 536, PAI II<sub>J96</sub>, PAI I y II de *E. coli* CFT073 y asociaciones negativas entre el GF D y las citadas PAIs ( $p \leq 0,05$ ).

**Conclusiones:** Las cepas de *E. coli* pertenecientes al GF B2 presentaron una mayor frecuencia de PAIs (46,8% cepas con PAI, media de 3,17 PAIs/cepa). Los GF D y A mostraron la misma frecuencia de PAIs (13,3%, con medias de 1,1 PAIs/cepa el GF D y de 2,31 el GF A). El GF B1 era el que contenía menor frecuencia de PAIs (4,2%, media de 0,78 PAIs/cepa). Los resultados obtenidos sugieren que hay una clara correlación entre la presencia de PAIs y el grupo potencialmente patógeno B2, pero no tan evidente con el grupo D.

## 547

### DETECCIÓN DE MARCADORES DE ISLAS DE PATOGENICIDAD (PAIs) EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENAS Y COMENSALES

M. Sabaté, G. Prats, E. Moreno, T. Pérez y A. Andreu  
 Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

**Objetivos:** Detectar la presencia de bloques de ADN exógenos que contienen genes codificantes de factores de virulencia (PAIs), en cepas uropatógenas y comensales de *E. coli*.

**Métodos:** En 165 cepas de *E. coli*: 100 uropatógenas no clonales, 22 clonales con escasos factores de virulencia y 43 aisladas en heces de personas sanas, se estudió la presencia de marcadores de las ocho PAIs descritas en cepas uropatógenas (PAI I, II, III y IV de *E. coli* 536; PAI I y II de *E. coli* J96; PAI I y II de *E. coli* CFT073) mediante PCR, utilizando cebadores específicos.

**Resultados:** De las 100 cepas no clonales de *E. coli* uropatógeno, el 91% albergaban PAIs. De éstas un 19% presentaba una PAI, un 23% dos PAIs, 17% tres, 5% cuatro, 9% cinco, 16% seis y 2% siete PAIs. La PAI IV<sub>536</sub> fue la más frecuente (88%), seguida de la PAI I (73%), II (45%) de *E. coli* CFT073, PAI II<sub>J96</sub> (34%), PAI I (33%), II (20%) y III (2%) de *E. coli* 536. En ninguna cepa se detectó la PAI I<sub>J96</sub>. Se observó la existencia de asociaciones estadísticamente significativas entre las diferentes PAIs ( $p \leq 0,05$ ), con excepción de la PAI III<sub>536</sub>. De las 22 cepas del grupo clonal, el 91% presentaba únicamente la PAI IV<sub>536</sub>, mientras que en el 9% restante no se detectaron PAIs. De las 43 cepas de *E. coli* comensales, la mayoría (53,4%) carecía de PAIs. Un 11,6% presentaban una PAI, 6,9% dos, 20,9% tres y 6,9% seis PAIs. La PAI IV<sub>536</sub> fue la más frecuente (46,5%), seguida por la PAI I (34,9%), II (27,9%) de *E. coli* CFT073, PAI II<sub>J96</sub> (6,9%), PAI I (6,9%) y II (6,9%) de *E. coli* 536. En ninguna cepa se detectó PAI III<sub>536</sub> ni PAI I<sub>J96</sub>. Se asociaron significativamente la PAI I, II de *E. coli* CFT073 y éstas a su vez se hallaban asociadas a la PAI I, II y IV de *E. coli* 536 ( $p \leq 0,05$ ).

**Conclusiones:** La presencia de PAIs es superior en cepas uropatógenas no clonales de *E. coli* (91% cepas con PAIs; media de 2,9 PAIs/cepa), que en cepas de *E. coli* comensales fecales (46,5% cepas con PAIs; media de 1,3 PAIs/cepa). Sin embargo, en el grupo uropatógeno clonal se detectó únicamente una PAI (91% cepas con PAIs). La PAI IV<sub>536</sub> es la más ampliamente distribuida, tanto en *E. coli* uropatógenos (88%) como en comensales (46,5%).

## 548

### CARACTERIZACIÓN DE 16 CEPAS UROPATÓGENAS DE *ESCHERICHIA COLI* PERTENECIENTES A LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS A Y B1.

E. Moreno, T. Pérez, M. Sabaté, I. Planells, A.M. Planes y A. Andreu

*Servei de Microbiologia. Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.*

**Introducción:** De los 4 grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) en los que se clasifica *E. coli*, las cepas con un menor potencial de virulencia pertenecen a los grupos A y B1. El objetivo de este trabajo es el de caracterizar 16 cepas de *E. coli* causantes de pielonefritis y urosepsis pertenecientes a dichos grupos no patógenos.

**Métodos:** De entre 100 cepas uropatógenas estudiadas (50 productoras de pielonefritis y 50 de urosepsis) 11 pertenecían al grupo filogenético A y 5 al grupo B1. Tanto los grupos filogenéticos (GF) como los genes de los factores de virulencia (FV): *papA*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fimH*, *afa/draBC*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *cnf1*, *iutA*, *fyuA*, *kpsTII*, *ibeA*, *traT* y marcador de la PAI I<sub>CFT073</sub>, se caracterizaron mediante PCR.

**Resultados:** Causaron pielonefritis 3 cepas del GF A y 3 del B1, y urosepsis 8 cepas del GF A y 2 del B1. La edad media de los pacientes (9 mujeres, 7 hombres) fue de 60,6 años. Todos, excepto uno con urosepsis, presentaron factores predisponentes de ITU. Las 3 cepas pielonefritis del GF A poseían una media de 2,3 FV y las 3 del B1 de 3,7. En las 6 cepas se detectó *fimH*; en 3 se detectó además *traT*, *iutA* y *fyuA*; y en 1 *sfa/focDE*, *kpsTII* y *papA*. Las 8 cepas productoras de urosepsis del GF A poseían una media de 5,5 FV y las 2 del B1 de 6,5. Entre ellas existió gran variabilidad en el número de FV. Tres cepas mostraron bajo grado de virulencia (media 2,7 FV), detectándose en 2 cepas *fimH*, *traT* y *iutA* y en 1

*fimH* y *papA*. Otras 4 cepas presentaron un grado intermedio (media 5,75 FV), los FV más representativos fueron *fimH* detectado en las 4 cepas y *papGII*, *kpsTII*, *iutA* y *fyuA* en 3. Las 3 cepas restantes fueron altamente virulentas (media 8,7 FV), en todas ellas se detectó PAI I<sub>CFT073</sub>, *papGII*, *papA*, *fimH*, *kpsTII*, *iutA* y *fyuA*; en 2 cepas *sfa/focDE*, *hlyA* y *traT*.

**Conclusiones:** De las 16 cepas de *E. coli* estudiadas de los GF A y B1, las 6 productoras de pielonefritis y 3 de urosepsis mostraron un grado bajo de virulencia, siendo capaces de producir infección presumiblemente porque los pacientes presentaban factores predisponentes de ITU. Por el contrario, las restantes 7 cepas causantes de urosepsis mostraron un nivel intermedio o alto de virulencia, con un mínimo de 5 FV/cepa, sugiriendo que los *E. coli* de GF no patógenos pueden adquirir FV mediante la transmisión horizontal de estos desde las cepas patógenas de los grupos B2 y D.

## 549

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE ORIGEN CLÍNICO Y ALIMENTARIO

C. Salcedo, R. Abad, M.J. Uría, R. Enriquez, B. Alcalá y J.A. Vázquez

*Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda (Madrid). Grupo de Estudio de Listeriosis de Barcelona.*

**Objetivo:** Definir e identificar clones de *L. monocytogenes* que circulan y producen casos de listeriosis en nuestro país mediante la aplicación de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y "Multilocus Sequence Typing" (MLST), un nuevo marcador molecular recientemente desarrollado para esta especie.

**Material y métodos:** Un total de 386 cepas fueron estudiadas, de las cuales 205 procedían de casos de listeriosis humana, 26 de casos de listeriosis animal y 155 de alimentos. Estas cepas fueron aisladas a lo largo de un amplio período de tiempo (1990-2002) en 30 provincias españolas. En esta muestra estuvieron representados los serotipos más frecuentemente relacionados con casos de listeriosis (4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c). El ADN cromosómico de todas ellas fue digerido con los enzimas de restricción *ApaI* y *AscI* y posteriormente sometido a electroforesis en campo pulsado. MLST se llevó a cabo analizando la secuencia parcial de siete genes *housekeeping* y fue aplicado a una muestra de 84 cepas representantes de diferentes perfiles electroforéticos (PTs).

**Resultados:** Se identificó una amplia variedad de PTs con ambos enzimas de restricción (93 PTs *ApaI* y 82 PTs *AscI*). MLST permitió identificar 34 combinaciones alélicas diferentes. El análisis filogenético realizado a partir de ambos tipos de datos (perfiles de restricción y secuencias genéticas) resultó altamente coincidente y permitió identificar una serie de clusters o grupos poblacionales correspondientes a cepas de un mismo serotipo. Un alto porcentaje de las cepas de serotipo 4b (50%) y 1/2b (61%) analizadas resultaron genéticamente relacionadas apareciendo agrupadas en un mismo cluster. Una proporción elevada de las cepas de estos dos serotipos aisladas de alimentos resultaron genotípicamente idénticas o estrechamente relacionadas con cepas aisladas de casos de listeriosis humana y animal. Las cepas de serotipo 1/2a presentaron mayor diversidad genética así como una diferente distribución de genotipos en función de su origen de aislamiento.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que las cepas de serotipos 4b y 1/2b responsables de casos de listeriosis en nuestro país pertenecen a un número reducido de clones genéticamente estables que son los mismos que son aislados en alimentos. Las cepas de serotipo 1/2a presentaron una distribución más heterogénea en función de su origen.

## 550

**APLICACIÓN DE MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS EN LA TRAZABILIDAD DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI***

D. Pérez-Boto\*, J.A. López-Portolés\*, F.J. García-Peña\*\*, C. Simón\*, J.C. Abad\*\*\*, I. Varo\*\* y M.A. Echeita\*

\*Sección de Enterobacterias, Laboratorio de Campylobacter, Servicio de Bacteriología. C.N.M. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid. \*\*Laboratorio de Campylobacter, Laboratorio Central de Veterinaria. Algete, Madrid. \*\*\*Cobb Española, S.A., Alcalá de Henares, Madrid.

**Introducción:** *Campylobacter jejuni* es una de las primeras causas de toxoinfección alimentaria en países industrializados, y el pollo la principal fuente de infección. En el hombre la mayoría de los casos de campilobacteriosis son esporádicos, siendo rara la aparición de brotes.

**Objetivos:** Estudiar la epidemiología de las campilobacteriosis utilizando diversos métodos de tipificación en cepas de *C. jejuni*. Valorar estos métodos considerando la inestabilidad genética descrita en *C. jejuni*.

**Material y métodos:** Se estudiaron 34 cepas de *C. jejuni*, procedentes de aves relacionadas por trazabilidad: 24 cepas de una granja de aves parentales a 23 y 48 semanas y 10 cepas de su descendencia a 10 semanas. Se seleccionaron 50 cepas de origen humano recibidas en el laboratorio durante el mismo período de tiempo. Se estudió la CMI de las cepas, frente a ERI, CIP, AMX, AMC, GEN, CHL y TCY (siglas WHONET). La serotipificación (S) se llevó a cabo por hemaglutinación indirecta con sueros producidos en el laboratorio y comerciales. Se determinó el patrón de restricción del gen *flaA* con la enzima *DdeI* (F) y del cromosoma por PFGE con *SmaI* (Sma).

**Resultados:** Las cepas procedentes de aves parentales de 23 semanas eran serotipo 44, CIP-R, identificándose 2 tipos: S44/F4/Sma110 y S44/F11/Sma52. Se encontró mayor diversidad de tipos en las cepas obtenidas 25 semanas después. Se identificaron los serotipos 44, 18 y 19. Los tipos más frecuentes fueron S44/F31/Sma30 sensible y S19/F32/Sma52 CIP-R. También se encontró el tipo S44/F4/Sma110 CIP-R, identificado en las aves de 23 semanas. En las procedentes de la descendencia se identificaron los tipos S44/F1/Sma61 CIP,AMX,TCY-R; S18/F7/Sma 59 o 60 CIP,AMX-R y S19/F13/Sma62 o 63 CIP,AMX-R. En las cepas de origen humano se determinaron 11 serotipos (ID = 0,90), 20 tipos F (ID = 0,94) y 30 pulsotipos *SmaI* (ID = 0,97). El serotipo más frecuente fue el 44 y el resistotipo CIP,AMX,TCY-R.

**Conclusiones:** La clonalidad de un conjunto de cepas de *C. jejuni* solo se puede sospechar en cepas procedentes de un brote o de colonización reciente. La diversidad de tipos en sucesivos aislamientos de aves relacionadas indicaría la inestabilidad genética descrita. El serotipo debería ser el primer marcador en estudios epidemiológicos. Su combinación con otros marcadores mejora la información epidemiológica: coexistencia de clones, colonizaciones sucesivas, etc.

## 551

**DETECCIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *BORDETELLA PERTUSSIS***

J. García Martínez, F. Chaves, E. Salto y J.R. Otero

**Introducción:** La infección respiratoria por *Bordetella pertussis*, cuyo diagnóstico microbiológico continua siendo lento o poco fiable, es una importante causa de morbilidad infantil especialmente en los menores de 6 meses de edad. El objetivo fue valorar una técnica de PCR en tiempo real para el diagnóstico de la Tosferina y estudiar la epidemiología molecular de las infecciones respiratorias causadas por *B. pertussis* en nuestra área.

**Métodos:** Durante 1 año se obtuvieron los exudados nasofaríngeos, mediante dos torundas de Dacron®, de los pacientes con sospecha clínica de Tosferina. Una de las muestras se inoculó en una placa y un tubo de agar Regan- Lowe, incubados a 37°C, en ambiente húmedo y aerobio durante 8 y 4 días, respectivamente, dando un pase del tubo a una placa del mismo medio e incubándose otros 8 días. Con otra de las muestras se realizó una inmunofluorescencia directa (IFD), usando anticuerpos monoclonales (Difco) contra un lipooligosacárido de la superficie celular, y posterior extracción del ADN para la realización de PCR en tiempo real (LightCycler®) usando primers y una sonda beacon diseñados para la amplificación y detección de un fragmento de 181 pb de la secuencia repetitiva de inserción IS481. Los aislados clínicos de *B. pertussis* de este período, así como 3 obtenidos en 1997, 2000 y 2001 se estudiaron mediante electroforesis en campos pulsados con la enzima *XbaI*.

**Resultados:** De 87 muestras analizables, el cultivo, la IFD y la PCR recuperaron 17, 22 y 33 casos, respectivamente; 12 muestras fueron positivas por las 3 técnicas, mientras que 2 muestras se diagnosticaron por cultivo, con PCR negativa, y en 18 se detectó genoma de *B. pertussis* sin aislamiento en el medio de cultivo. Los 17 aislados de *B. pertussis* se agruparon en 4 genotipos diferentes: genotipo I, 7 aislados (41,2%); genotipo II, 6 (35,3%); genotipo III, 1 (5,9%); y el genotipo IV, 1 (5,9%). El genotipo I agrupaba también los aislados obtenidos en 1997 y 2001. El genotipo II estaba íntegramente compuesto por aislados del 2003.

**Conclusión:** Las infecciones por *B. pertussis* están infra-diagnosticadas y la utilización de la PCR contribuye a un mayor rendimiento del diagnóstico microbiológico. Se evidencia la diseminación de 2 genotipos responsables de la mayoría de los casos detectados, estando 1 de ellos presente en la población de estudio desde al menos 1997.

## 552

**APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DEL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

L. Herrera, P. Saíz, A. Valverde, T. Molina y M.S. Jiménez

Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. Servicio de Bacteriología. C.N.M. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

En el denominado complejo tuberculoso (CMTB) se engloban las especies *M. tuberculosis*, *M. africanum* (subtipos I y II), *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. microti*, *M. caprae* y *M. tuberculosis* subsp. *canettii*. Estas especies son las causantes de la tuberculosis en humanos y animales. Un diagnóstico diferencial a nivel de especie es importante porque implica la instauración de una adecuada pauta de tratamiento y un conocimiento de la epidemiología de la infección.

**Objetivos:** Existen numerosas técnicas moleculares desarrolladas por diversos grupos de trabajo encaminadas a la identificación de estas especies. El Laboratorio de Referencia de Micobacterias, LRM, ha venido evaluando cada una de ellas hasta crear un esquema de identificación rápido y sencillo que puede implantarse en la mayoría de los laboratorios hospitalarios a un bajo coste.

**Material y métodos:** Se estudiaron 251 cepas, 207 de origen humano, y 44 de origen bovino. El esquema de identificación diseñado consiste: 1. PCR-RFLP del gen *gyrB* con la enzima *RsaI* (Niemann et al., 2000) obteniéndose tres patrones distintos según las especies: 360/560pb para *M. tuberculosis*/*M. africanum* (subtipos I y II), 360/480pb para *M. bovis*/*M. bovis*-BCG y 360/660pb específico para *M. microti*. 2. Para identificar *M. tuberculosis*/*M. africanum* (subtipos I y II) se realiza una PCR-multiplex que detecta la ausencia/presencia de la región RD9 (Parson et al., 2002). La diferenciación de los subtipos de *M. africanum* se obtiene mediante la digestión con *TaqI*, del gen *gyrB* amplificado. 3.

Para identificar *M. bovis*/*M. bovis*-BCG se realiza una PCR-multiplex que detecta la presencia/ausencia de la región RD1 (Talbot et al., 1997). 4. La identificación de *M. canettii* se realiza mediante PCR-RFLP de un fragmento del gen *hsp65* con *HhaI* (Goh et al., 2001). El patrón de bandas que se obtiene para esta especie (60/105/260pb) la diferencia del resto de miembros del CMTB (60/75/105/185pb).

**Resultados:** 251 cepas pertenecientes al CMTB (73 *M. bovis*, 20 *M. bovis*-BCG, 8 *M. africanum* y 150 *M. tuberculosis*) fueron analizadas según este esquema con resultados totalmente concordantes con los sistemas convencionales que clásicamente se han utilizado en el LRM (morfología de la colonia, crecimiento en presencia de 5 µg/ml de hidracida del ácido 2-tiofenocarboxílico y de 10 µg/ml de tiocemicarbazona, sensibilidad frente a 50 µg/ml de Pirazinamida, producción de niacina, reducción de nitratos y medida de la actividad catalásica a 68 °C).

**Conclusiones:** Este esquema de caracterización molecular permite la identificación en un tiempo muy corto de las especies del complejo tuberculoso con un 100% de sensibilidad y especificidad.

## 553

### ESTUDIO COMPARATIVO INNO-LIPA MYCOBACTERIA VS GENOTYPE MYCOBACTERIUM PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS AISLADAS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO MB/BACT

V. González, M.A. Pallarés, E. Padilla, A. Pérez, M.D. Quesada, S. Molinos y V. Ausina

*Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona. Barcelona.*

**Introducción:** Desde la introducción de los métodos de cultivo líquido, el tiempo requerido para la detección e identificación de micobacterias ha sido acortado significativamente. En comparación con el medio sólido, los medios de cultivo líquido no sólo detectan crecimiento micobacteriano más rápidamente sino que también aumentan el ratio de recuperación de micobacterias. La aplicación de técnicas moleculares para la identificación de micobacterias aisladas en medio líquido han dado paso a un diagnóstico de la tuberculosis más rápido y preciso. Inno-LiPA Mycobacteria y GenoType® Mycobacterium son dos tests diseñados para la identificación de micobacterias mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de una hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa.

**Material y métodos:** Inno-LiPA MYCOBACTERIA v2 identifica simultáneamente 17 especies de micobacterias. GenoType® Mycobacterium, permite la identificación simultánea de 13 especies de micobacterias. Ambos tests fueron evaluados en 110 cepas micobacterianas (cepas de referencia y muestras clínicas) incluyendo 24 especies de micobacterias diferentes. Todas ellas fueron previamente inoculadas en botellas de MB/BacT. Para todas las cepas clínicas testadas, la presencia de producto amplificado también fue verificado en gel de agarosa.

**Resultados:** La sensibilidad de ambos tests, definida como el número de resultados positivos obtenidos con la sonda del género Mycobacterium junto con resultados interpretables, fue 110/110 (100%) para Inno-LiPA y 102/110 (92,7%) para GenoType®. Para muestras con resultados interpretables, el test Inno-LiPA identificó correctamente 109/110 muestras (99,1%) mientras que el GenoType® identificó 100/102 muestras (98,0%). Los resultados discrepantes fueron determinados por técnicas de secuenciación.

**Conclusiones:** Ambos tests son métodos rápidos y fiables en la identificación de micobacterias. El test Inno-LiPA fue más sensible y preciso que el test GenoType®. Debido al diferente número de especies micobacterianas existentes y a las diferentes micobacterias que pueden ser identificadas

por cada método, la verdadera importancia clínica de estos tests también depende de la frecuencia de micobacterias atípicas aisladas en cada país.

## 554

### IDENTIFICACIÓN DE LOS CLONES DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE DE SEROTIPO 6B CIRCULANTES EN ESPAÑA MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE LOS GENES "HOUSEKEEPING"

M. Ortega, A. Fenoll, S. Berrón, J. Casal e I. Jado

**Introducción/Objetivos:** Para poder entender la biología poblacional de *Streptococcus pneumoniae* así como los factores requeridos para su virulencia es necesario realizar estudios que permitan la identificación de los clones más importantes que producen enfermedad. En el laboratorio de Referencia de Neumococo se ha encontrado que de las 15.000 cepas, procedentes de hospitales españoles, estudiadas en los últimos 10 años, el 83% se engloba en tan sólo 15 serotipos, siendo el serogrupo 6 el segundo más frecuentemente aislado. Además, dentro de este serogrupo, el serotipo 6B ocupa el tercer lugar como causa de infección neumocócica a nivel mundial y presenta una elevada tasa de cepas resistentes a numerosos antibióticos. Por todo ello ha sido incluido en una nueva generación de vacunas conjugadas. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de los clones de serotipo 6B circulantes en España.

**Material y métodos:** Se realizó la identificación de los clones de *Streptococcus pneumoniae* de serotipo 6B a partir de 31 cepas invasivas, 25 no invasivas y 26 de portadores asintomáticos (n = 82). Se utilizó la técnica de tipado molecular Multilocus Sequence Typing (MLST), lo que nos permitió conocer el fondo genético de las cepas, su diversidad y las posibles relaciones evolutivas entre ellas. Además, mediante un modelo experimental animal de septicemia puesto a punto en el laboratorio se analizó cuáles de estos clones descritos podrían presentar una mayor virulencia.

**Resultados y Conclusiones:** Se encontró que las cepas de portadores eran genotípicamente más diversas mientras que los aislados clínicos eran mucho más homogéneos. Así, el 80% de las cepas clínicas (invasivas y no invasivas) se englobarían dentro del clon español multirresistente Spain<sup>6B-2</sup>, uno de los clones con mayor prevalencia en todo el mundo, mientras que en las cepas de portadores este porcentaje descendía al 50%. Por otro lado, se observó que los clones de serotipo 6B evolucionaban principalmente por procesos de recombinación y en menor medida por mutaciones. Además, el porcentaje de cepas virulentas estaba relacionado con el origen clínico de las cepas, ya que las cepas de portadores fueron menos virulentas que las aisladas de pacientes y, dentro de éstas, se halló una mayor virulencia en aquellas que pertenecían al clon Spain<sup>6B-2</sup>. Esto pone de manifiesto la implicación de este clon multirresistente en la infección neumocócica invasiva producida por cepas de serotipo 6B.

## 555

### EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE PCR A TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR PARVOVIRUS B19

N. Margall Coscojuela, N. Rabella García, C. Checa Ruiz, J. Alonso Rodríguez, G. Esteban Calm, S. Sambeat Domenech y M. Herrero Rabanete

**Objetivo:** Determinar la eficacia de una técnica de PCR a tiempo real con control interno (*RealArt® Parvo B19 LC*, Artus, Germany) para el diagnóstico de infección por parvovirus B19.

**Material y métodos:** Se seleccionaron retrospectivamente 22 sueros de 18 pacientes (14 mujeres y 4 varones, rango de edad 20m-42a, media 20,1a) con sospecha clínica de infección por parvovirus B19 y anticuerpos específicos de la clase IgM

(IF, Biotrin) para la PCR. La extracción del DNA se efectuó con el preparado comercial *QIAamp DNA Mini Kit*<sup>®</sup> (Qiagen) y la PCR con el equipo *Light Cycler*<sup>®</sup> 1.5 (Roche). En 16 de los 22 sueros se cuantificó la concentración de DNA. Se revisó retrospectivamente la historia clínica de los pacientes.

**Resultados:** La sensibilidad del método fue de 10 copias/μl y el tiempo de realización de 90 minutos. La concentración de DNA en las 16 muestras cuantificadas osciló entre 6,24 x 10<sup>1</sup> y 1,01 x 10<sup>6</sup> copias/μl, con una media de 6,79 x 10<sup>4</sup> copias/μl. Sólo en una muestra se detectó más de 10<sup>4</sup> copias/μl. El 94,4% (17/18) de los pacientes tuvieron DNA de parvovirus B19 en el suero. Si consideramos que los 18 pacientes tenían 20 muestras con IgM positivas, la concordancia de positividad entre las dos técnicas fue del 85% (17/20). Dos muestras fueron negativas por PCR y positivas para la detección de IgM, en ambas el control interno de la PCR fue positivo. La detección de ácidos nucleicos se objetivó en una muestra ininterpretable por serología de un paciente con una muestra previa positiva. De los pacientes cuya historia clínica fue revisada, todos presentaron manifestaciones clínicas compatibles con infección por parvovirus B19 (poliartralgias, exantema súbito, pancitopenia, entre otras).

**Conclusiones:** 1) La técnica de PCR a tiempo real de *Artus* es rápida y de fácil ejecución 2) El método permite diagnosticar la infección aguda por parvovirus B19 3) Además, sirve para cuantificar la concentración del genoma del virus lo que podría ser útil para controlar la infectividad del paciente.

## 556

### ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLADOS DE ECHOVIRUS TIPO 11 EN ESPAÑA

A. Avellón, I. Casas, G. Palacios y G. Trallero

**Introducción:** El Echovirus 11 (E11) es uno de los Enterovirus Humanos que se caracteriza más frecuentemente en España, junto a los Echovirus 30, 6 y 9. Se asocia especialmente con la producción de brotes de meningitis aséptica aproximadamente cada 3-4 años (En España 1993, 1996, 1999 y 2003). Se ha descrito la co-circulación en el tiempo y el espacio de E11 pertenecientes a distintos grupos filogenéticos (Oberste et al 2003).

**Objetivo:** Análisis filogenético de aislados de E11 en España. Identificación de clusters.

**Material y métodos:** En el análisis se incluyeron cepas españolas obtenidas hasta el año 2003, junto a cepas depositadas en las bases de datos, incluyendo las cepas de referencia de E11 y Echovirus 19. Se amplificó el extremo 3' de la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) por RT-PCR y posteriormente se secuenció según método descrito por Casas et al. 2001. Los árboles se reconstruyeron mediante el método Neighbour-Joining, 1000 pseudorepeticiones, Kimura 2p.

**Resultados:** La mayoría de los aislados se agruparon juntos en el cluster definido por Oberste et al. como D5. Se observaron subgrupos diferenciados según el año de aislamiento de las cepas. Por otro lado al menos 2 aislados se encuadraron en un grupo filogenético distinto a todos los demás aislados españoles.

**Conclusiones:** En España, habitualmente detectamos E11 perteneciente a un grupo mayoritario, sin embargo se demuestra que, al contrario de lo que ocurre con otros enterovirus como Echovirus 30, existe la co-circulación temporal y espacial de cepas pertenecientes a distintos grupos filogenéticos.

## 557

### EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO

J.L. Juan, O. Fraile, O. Esparcia, D. Martínez, D. Navarro y C. Gimeno

**Objetivo:** Evaluar los métodos de PCR: HPV REAL (Durviz), HPVfast (Genomica) e INNO-LiPA HPV (Innogenetics) para detectar y tipificar PVH.

**Material y métodos:** Se analizaron 264 muestras de cérvix uterino obtenidas de otras tantas pacientes (mayo de 2002-abril de 2003) en el servicio de Ginecología del HCUV. De ellas, 197 de las pacientes presentaban lesiones compatibles con infección por PVH. Las muestras fueron analizadas mediante los métodos aludidos. Para dilucidar los resultados discordantes se secuenció (ABI Prism 310) parte del ORF L1 tras amplificación con iniciadores consenso.

**Resultados:** 35 muestras (17,2% de las muestras con lesiones y 13,5% del total) fueron positivas por HPV REAL e INNO-LiPA HPV (Innogenetics) y, 20 mediante el equipo HPVfast (Genomica), lo que corresponde a un 57% de las muestras obtenidas por los otros métodos. La tipificación de las muestras coincidió en el caso de INNO-LiPA HPV (Innogenetics) y HPVfast (Genomica). Sin embargo, se obtuvieron resultados discrepantes en dos muestras, identificadas como PVH-18 por HPV REAL y como PVH-45 tanto por HPVfast como por INNO-LiPA HPV (Innogenetics). La secuenciación de estas muestras confirmó el genotipo 45. Además el equipo HPV REAL sólo detecta 6 genotipos a diferencia de los otros que permiten detectar más de 30 genotipos distintos. Se analizó la asociación entre la presencia de PVH, genotipos y algunos parámetros clínicos. La prevalencia de PVH entre pacientes sin lesiones fue del 6%. En pacientes diagnosticadas con CIN I se obtuvo un 33% de muestras positivas, con CIN II un 50%, con CIN III un 20%, con verrugas genitales un 100%, con LSIL un 29% y con HSIL un 54%. En estas muestras el predominio mayor correspondió a PVH16. En pacientes diagnosticados con condilomas el 67% fueron positivas, siendo el genotipo más frecuentes el 6.

**Conclusiones:** El equipo de cribado de HPVfast mostró un número de positivos significativamente inferior (20/35) a los equipos de cribado HPV REAL e INNO-LiPA HPV. El equipo de genotipado HPV REAL identificó de forma errónea en dos muestras un genotipo 18, tratándose de un genotipo 45. Se observa una asociación significativa entre HPV y CIN I, CIN II, CIN III, colicocitosis, condilomas, verrugas genitales, HSIL y LSIL, no observándose con mosaico, base, leucoplasia, AGUS y ASCUS.

## 558

### DESARROLLO DE UN MODELO DE INFECCIÓN IN VITRO POR VIH EN MACRÓFAGOS HUMANOS PARA ANALIZAR EL PAPEL DE LA INFECCIÓN POR MICOBACTERIAS EN LA REPLICACIÓN VIRAL

M.D. Figueira, A. Boluda y R. Delgado

*Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.*

**Introducción:** La infección de macrófagos humanos por VIH *in vitro* es difícil y normalmente requiere añadir al medio de cultivo factores estimulantes de colonias que aumentan por sí mismos la replicación viral enmascarando el papel que la coinfección por micobacterias pueda desempeñar.

**Objetivo:** Desarrollar un modelo de infección utilizando retrovirus recombinantes para analizar el papel que la infección micobacteriana y diversas citoquinas tienen en la replicación del VIH en macrófagos humanos.

**Material y métodos:** Se infectaron macrófagos diferenciados a partir de células mononucleares de sangre periférica con un vector retroviral basado en PNL4-3 luc/gfp R' E' pseudotipado con la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) con una MOI 1:100. Después de 5 días los macrófagos fueron coinfectados con 7 cepas de *M. tuberculosis* (H37Rv y 6 aislados clínicos con diferentes patrones de sensibilidad), *M. avium* y *M. fortuitum* utilizando una MOI 1:1. El efecto de varias citoquinas (IL-1β, IL-4, IL-10, TNF-α, IFN-γ) y sonicados de *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. fortuitum* fueron también analizados. Después de 72 horas de estimulación o infección con micobacterias se cuantificó la replicación del VIH midiendo la actividad luciferasa. Cada ex-

perimento se realizó utilizando al menos células de 3 donantes diferentes.

**Resultados:** El porcentaje de macrófagos infectados utilizando retrovirus recombinantes fue del 50%. La coinfección con micobacterias incrementó la replicación del VIH (entre 1.58 y 4.2 veces), aunque sólo fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) cuando los macrófagos fueron coinfectados con las cepas de *M. tuberculosis*. Las citoquinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  produjeron también un aumento significativo de la replicación viral, mientras que los soncados de las diferentes especies micobacterianas aumentaron la replicación en menor cuantía que la infección con bacilos viables.

**Conclusiones:** El modelo de infección *in vitro* por VIH utilizado en nuestro estudio permitió obtener una alta tasa de infección en macrófagos humanos diferenciados, y estudiar el efecto que la coinfección por micobacterias y la producción de diversas citoquinas por parte del macrófago puedan tener sobre la replicación viral. Las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  y la coinfección con *M. tuberculosis* incrementaron significativamente la replicación por VIH.

## 559

### VALORACIÓN DE UNA PCR A TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN AGUDA POR *TOXOPLASMA GONDII*

N. Margall Coscojuela, C. Muñoz Batet, N. Martí Orench, R. Soler Martínez, E. García Losilla y D. de Miniac Pavillard

**Objetivo:** Determinar la sensibilidad y especificidad de una PCR a tiempo real, con control interno incorporado en la misma mezcla de reacción, para el diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii* en el feto o en el paciente VIH positivo.

**Material y métodos:** La extracción del DNA se realizó a partir de 200  $\mu$ l de muestra con el preparado comercial de Roche (*High genomic DNA template preparation*). La amplificación y detección se efectuó con el equipo *Light Cycler 1.5* (Roche) utilizando sondas FRET. La región específica a amplificar correspondía al gen B1 y la diana para el control interno era un fragmento del gen de la  $\beta$ -globina. Las condiciones de hibridación y número de ciclos de amplificación se ajustaron para posibilitar el *annealing* de ambas dianas. Se utilizó una cepa control para determinar la sensibilidad experimental mediante diluciones seriadas. Asimismo se analizaron 20 muestras de diferentes localizaciones anatómicas: 7 LCR, 5 líquidos amnióticos, 4 sangres, 1 orina, 1 humor acuoso, 1 humor vítreo y un control de calidad internacional. Todas habían sido procesadas previamente por el método de *nested*-PCR e hibridación inmunoenzimática [Sorin Biomedica]. Las muestras (14 positivas y 6 negativas) se habían conservado a -20°C.

**Resultados:** La sensibilidad de la PCR a tiempo real fue de 35,8 taquizoitos/ml. En el control y en 10 de las 14 muestras positivas se objetivó DNA del parásito por PCR a tiempo real (6 LCR, 3 LA, 1 sangre y 1 humor vítreo). Las 4 muestras restantes fueron negativas. Sin embargo, en dos de ellas se trabajó con un volumen inferior al requerido (60  $\mu$ l y 100  $\mu$ l). Una muestra (LA) de las 6 negativas por PCR-EIA fue positiva por PCR a tiempo real. En todos los casos el control interno fue positivo. El tiempo de realización de la nueva técnica de PCR es de 2 horas, en cambio la de *nested*-PCR e hibridación inmunoenzimática es de 3 días.

**Conclusiones:** 1) El método de PCR a tiempo real efectuado en nuestro laboratorio presenta una sensibilidad y especificidad que lo hacen adecuado para su incorporación en el diagnóstico de rutina. 2) Su tiempo de ejecución permite efectuar un diagnóstico de forma rápida. 3) Se reduce el riesgo de contaminación respecto a la técnica de *nested*-PCR.

## 560

### DESCONTAMINACIÓN DE REACTIVOS DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA REALIZACIÓN DE PCR UNIVERSAL 16S rDNA, DIRECTAMENTE EN MUESTRAS CLÍNICAS, EN SISTEMA LIGHT-CYCLER

M. Marín, N. García Escribano y E. Bouza

**Objetivo:** Seleccionar un método adecuado para la eliminación de ADN bacteriano contaminante de los reactivos de PCR a tiempo real, como paso previo a su aplicación al diagnóstico molecular de infecciones bacterianas directamente en muestras clínicas, por PCR universal 16S rDNA, en sistema Light-Cycler®.

**Materiales y métodos:** Mediante PCR universal 16S rDNA, con oligos PSL y P13P y Sybr-Green en sistema Light-Cycler® (Roche), se han analizado controles negativos constituidos por alícuotas de agua libre de nucleasas y agua del kit Light-Cycler, así como ADN extraído de  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  ufc/ml de una cepa de *Streptococcus oralis* inoculada en medio de hemocultivos (BACTEC®-Becton-Dickinson). La identidad de los amplicones obtenidos se determinó por secuenciación. El ADN contaminante se intentó eliminar por 3 métodos de tratamiento de los reactivos de PCR: luz UV, DNasa I, endonucleasa *Sau3AI* y la reducción de ciclos de la PCR.

**Resultados:** se detectaron correctamente hasta  $10^2$  ufc/ml de *S. oralis*. El análisis de los controles negativos y del ADN extraído de  $10^1$  ufc/ml, reveló la presencia de ADN contaminante que amplificaba a partir del ciclo 29 de la PCR y que tenía una curva de melting diferente a los controles positivos. El tratamiento de los reactivos de PCR con luz UV y DNasa, en diferentes condiciones, eliminó el ADN contaminante, pero con una considerable disminución de la sensibilidad de la técnica. El tratamiento con *Sau 3AI* introdujo nuevo ADN contaminante en las muestras. Una reducción de 40 a 30 ciclos en la PCR permitió que los controles de agua salieran negativos, pero también redujo el límite de detección de la técnica.

**Conclusiones:** El método ensayado puede ser utilizado para la detección rápida de ADN bacteriano directamente en muestras clínicas normalmente estériles, siempre que no se requiera una elevada sensibilidad analítica. El empleo de técnicas de PCR universal 16S rDNA, en formato de PCR a tiempo real y directamente en este tipo de muestras, precisa reactivos altamente purificados. Aunque, la aplicación de métodos de descontaminación puede ayudar en este sentido, hace la técnica laboriosa, reduce la sensibilidad del ensayo y puede aumentar el riesgo de contaminaciones.