

Sesión 20

Aspectos microbiológicos y clínicos de las enfermedades infecciosas emergentes e infecciones por patógenos especiales

297

INFECCIÓN POR HANTAVIRUS Y ARENAVIRUS EN ROEDORES SALVAJES DE LA PROVINCIA DE SORIA

J. Ledesma^{1*}, M. Delgadillo¹, M. Pérez¹, J. Rocha¹, L. Lledó^{1*}, M.P. Sánchez-Seco^{2*}, C. Domingo^{2*}, G. Fedele^{2*}, J.L. Serrano³, J.J. Chamorro¹, M.A. González¹, J. Medina¹, J.V. Saz^{1*} y M.I. Gegúndez^{1*}

¹Dpto Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá.

²Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Viricas Importadas, CNM, ISCIII. ³Servicio Territorial de Sanidad y Bienestar Social de Soria. *Red de Investigación en Enfermedades Viricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores (EVITAR).

Introducción: Hantavirus y arenavirus son virus que tienen a los roedores como reservorios fundamentales. Su transmisión es generalmente por vía aérea y están involucrados en síndromes de diferente severidad en humanos. El objetivo de este trabajo es investigar la circulación de estos virus en roedores de Soria.

Materiales y métodos: Durante los años 2003 y 2004, se capturaron 167 micromamíferos en la región de Soria, de los cuales se tomaron muestras de pulmón, riñón, bazo y suero. Los sueros se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) usándose como antígeno células Vero E6 infectadas con los virus Puumala (PUUV), Seoul (SEOV) y por el virus de la linfocoriomeningitis (LCMV). Se empleó como conjugado suero de conejo anti-IgG de ratón. Además y para hantavirus, los sueros positivos fueron estudiados por western blot (WB) utilizando proteínas recombinantes de PUUV y SEOV, y como conjugado suero de conejo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa. Los tejidos, tras su homogenización y extracción del RNA, fueron analizados mediante una RT-Nested PCR, usando cebadores genéricos diseñados en regiones conservadas del segmento S de cada virus.

Resultados: Se detectaron 28 sueros positivos por IFI para hantavirus, de los cuales se confirmaron por WB 16 casos, lo cual indicaba una seroprevalencia del 9,58%. Los sueros pertenecían a roedores de las especies *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* y *Mus spretus*. El estudio para arenavirus reflejó 9 casos positivos por IFI, correspondiendo con una seroprevalencia del 5,39%. Los sueros procedían de roedores de las especies *A. sylvaticus*. Los ejemplares seropositivos para ambos virus se localizaron tanto por entornos naturales de recreo como por zonas habitadas. El estudio molecular no mostró ningún tipo de amplificación para ninguno de los dos virus.

Conclusiones: Los resultados ofrecen evidencias serológicas de la circulación de hantavirus y arenavirus en varias especies de roedores de Soria. La presencia de anticuerpos específicos frente a hantavirus en *Mus spretus*, roedor de distribución prácticamente restringida a la Península Ibérica, sugiere la posibilidad de hantavirus autóctonos. Es la primera vez en nuestro país que se detectan anticuerpos frente a LCMV en roedores de la especie *Apodemus sylvaticus*.

298

DETECCIÓN DE ARENAVIRUS RELACIONADOS CON EL VIRUS DE LA LINFOCORIOMENINGITIS (LCMV) EN ROEDORES DE ANDALUCÍA

J. Ledesma^{1*}, F. Carro^{2*}, G. Fedele^{3*}, M.P. Sánchez-Seco^{3*}, L. Álvaro¹, D. Pérez-Aranda², L. Lledó^{1*}, E. Varela^{4*}, M. Delgadillo¹, A. Negro³, R.C. Soriguer^{2*}, B. Regueiro^{4*}, J. García^{5*}, J.V. Saz^{1*}, A. Tenorio^{3*} y M.I. Gegúndez^{1*}

¹Dpto Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá.

²Estación Biológica de Doñana, CSIC. ³Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas, CNM, ISCIII. ⁴Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

⁵Complejo Hospitalario de Ourense. *Red de Investigación en Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores (EVITAR).

Introducción: El virus de la linfocoriomeningitis (LCMV), perteneciente a la familia *Arenaviridae*, tiene como reservorio principal al roedor *Mus musculus*. Puede transmitirse a humanos por aerosoles producidos a partir de excretas de roedores infectados y por vía congénita, pudiendo producir tanto cuadros neurológicos como abortos y malformaciones congénitas. Con este estudio se intenta investigar la infección por LCMV en roedores de diferentes zonas de Andalucía.

Materiales y métodos: Entre los años 2003 y 2004, se realizaron muestreos de micromamíferos en 5 provincias andaluzas, tomándose muestras de pulmón y suero de los roedores capturados. Los sueros fueron analizados mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), para lo cual se emplearon células Vero E6 infectadas con LCMV (Armstrong). Como conjugado se utilizó suero de conejo anti-IgG de ratón. Los órganos, tras su homogenización y extracción del RNA viral, se estudiaron mediante RT-Nested PCR, empleándose para el caso cebadores genéricos diseñados a partir de regiones conservadas del segmento pequeño (S) de distintos arenavirus. Todo producto de amplificación detectado fue secuenciado para su identificación.

Resultados: Se capturaron un total de 64 ejemplares, pertenecientes a 7 especies diferentes de roedores. Para el estudio serológico, se contó con 41 sueros, de los cuales 8 de ellos resultaron positivos (seroprevalencia del 19,51%). Los títulos oscilaron entre 1/16 y 1/1024. Todos los casos seropositivos se detectaron en sueros de roedores de la familia *Muridae*. La detección genómica fue positiva en 4 de los 64 pulmones analizados. Una vez secuenciados los cuatro segmentos amplificados, se identificaron como un virus correlacionado con LCMV. Tres de las muestras procedían de roedores de las especies *A. sylvaticus* capturados en Cádiz, Granada y Córdoba, mientras que la cuarta muestra pertenecía a un ejemplar de *Rattus norvegicus*, apresado en Huelva.

Conclusiones: La detección del genoma de un arenavirus relacionado con el LCMV en roedores de Andalucía, hace necesaria la realización de nuevos estudios con el fin de determinar su distribución geográfica real y el impacto que pueda tener en la salud humana.

299

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A HANTAVIRUS EN PACIENTES CON HIPERTRANSAMINEMIA

L. Lledó^{1,3}, M.I. Gegúndez^{1,3}, M. Delgadillo¹, R. González^{1,2}, J. Romanik², J. Ledesma^{1,3}, M. Pérez¹, J.V. Saz^{1,3} y M. Beltrán^{1,2}

¹Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá. ²Servicio de Microbiología, Hospital Príncipe de Asturias. ³Red de Investigación en Enfermedades Víricas Transmitidas por Artrópodos y Roedores (EVITAR).

Objetivos: Los Hantavirus, son agentes etiológicos de diversas patologías humanas, desde infecciones inaparentes a graves síndromes clínicos. En la mayoría de los cuadros clí-

nicos, con cierta frecuencia se asocia disfunción hepática y en aisladas ocasiones la manifestación principal de la infección es la alteración hepática. En este estudio nos planteamos investigar la seroprevalencia frente a Hantavirus en pacientes con elevación de transaminasas de etiología desconocida comparándola con un grupo control.

Material y métodos: Se estudiaron sueros de 182 pacientes con hipertransaminemia (122 hombres y 60 mujeres), y de 146 personas de población general con valores normales de transaminasas (70 hombres y 76 mujeres). Todos los sujetos del estudio provenían del área de salud 3 de la Comunidad de Madrid. Las técnicas empleadas como screening para la detección de anticuerpos (IgG) fueron la IFI y el ELISA (Focus). Como técnica de confirmación se utilizó el western-blot. Los antígenos utilizados fueron los virus Puumala, Seoul, Sin Nombre y Dobrava.

Resultados: En el grupo de los pacientes con hipertransaminemia se detectaron 11 con anticuerpos frente a Hantavirus, lo que representa una prevalencia del 6% (3,3% mujeres y 7,3% hombres). Los seropositivos tenían una edad entre 1-64 años (media 37, desviación estándar 19 años). 3 sujetos con anticuerpos específicos se hallaron en el grupo perteneciente a población general (2% de prevalencia, 1,3% mujeres, 2,8% hombres), de edades comprendidas entre 39-78 años (media 53,3, desviación estándar 16,4 años). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados ($p < 0.05$), pero no hubo diferencias por género ni edad en cada uno de ellos. El 63,6% de los seropositivos del grupo con transaminasas elevadas reaccionaron frente al virus Puumala y ninguno frente al virus Seoul. Sin embargo, los tres positivos del grupo de población general fueron reactivos exclusivamente frente al virus Seoul.

Conclusiones: Se confirma la presencia de infección por Hantavirus en las poblaciones estudiadas, pero con cifras de prevalencia significativamente superiores en el grupo de pacientes con hipertransaminemia, así como con un patrón serológico diferente, lo que sugiere la presencia de varios serotipos circulantes en esta zona, que probablemente estén relacionados con patología diferente.

300

DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS DE HUMEDALES ESPAÑOLES

A. Vázquez¹, M.P. Sánchez-Seco^{1,2}, L. Hernández¹, S. Ruiz³, C. Aranda⁴, E. Marqués⁵, R. Escosa⁶, M.A. Bustillo¹, F. Molero¹ y A. Tenorio¹

¹Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas. CNM. ISCIII. ²Unidad de Alertas y Emergencias. CNM. ISCIII.

³Servicio de Control de Mosquitos, Diputación Provincial de Huelva. ⁴Servicio de Control de Mosquitos del Braix Llobregat, Barcelona. ⁵Servicio de Control de Mosquitos Badía de Roses y Aiguamolls del Ampurdà, Gerona. ⁶Servicio de Control de Mosquitos del Delta del Ebro, Tarragona.

El género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*) está compuesto por más de 70 arbovirus zoonóticos. Al menos 30 afectan al hombre produciendo cuadros febriles, encefalitis o, incluso, cuadros hemorrágicos y muchos se consideran virus emergentes y/o re-emergentes. Existe un grupo de flavivirus transmitidos por mosquitos que engloba a virus de gran importancia en salud humana, como Dengue o West Nile, entre otros. Además se han descrito flavivirus en mosquitos que no replican en células de vertebrados y no parecen ser patógenos para el hombre. Estudios serológicos realizados en nuestro país sugieren la presencia, estable u ocasional, de flavivirus.

Objetivo: Búsqueda de flavivirus circulantes en España.

Materiales y métodos: Entre los años 2001 y 2005 se capturaron más de 7000 pools de mosquitos que se estudiaron amplificando un fragmento del gen de la polimerasa viral (NS5) mediante una RT-Nested-PCR genérica. La secuenciación de los pools positivos permitió la identificación de

los agentes detectados. Para realizar un análisis filogenético más profundo, se diseñó una RT-Nested-PCR que nos permite amplificar el gen completo de la polimerasa viral.

Resultados: Se obtuvo un total de 103 pooles de mosquitos en los que se consiguió amplificación. En todas las especies capturadas (*Aedes* sp., *Anopheles* sp., *Coquilletidia* sp., *Culex* sp., *Culiseta* sp., *Ochlerotatus* sp. y *Phlebotomus* sp.) detectamos secuencias de flavivirus excepto en *Coquilletidia* sp. La mayoría de las secuencias se agrupan con los virus de mosquitos que no replican en vertebrados, sin embargo, en dos pooles se ha encontrado una secuencia que presenta cierta relación genética con los virus transmitidos por mosquitos. Se ha obtenido la secuencia completa del gen de la polimerasa viral de representantes de ambos grupos, lo cual nos permite un estudio filogenético más profundo que confirma los resultados previamente obtenidos.

Conclusiones: Se han encontrado flavivirus en mosquitos españoles que parecen ser virus propios de los mosquitos y que pueden arrojar datos interesantes y novedosos sobre la evolución de este género. Además se han detectado virus que se agrupan con los flavivirus transmitidos por mosquitos y que podrían infectar al hombre u otros animales y podrían desempeñar algún papel en patología humana y/o veterinaria.

301

¿MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA EN BARCELONA?

J. Muñoz¹, M. Vergés², E. Ávila³, D. Alonso¹, B. Treviño³, J. Gómez³, M. Portús², G. Sanz⁴ y J. Gascon¹

¹Secció de Medicina Tropical. Centre de Salut Internacional. Hospital Clínic Barcelona. ²Departament Parasitologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. ³Unitat de Medicina Tropical i Salut Internacional Drassanes, Barcelona. ⁴Institut Clínic de Malalties Cardiovasculars. Hospital Clínic de Barcelona.

Introducción y objetivos: La enfermedad de Chagas es una zoonosis endémica en Latinoamérica. Las alteraciones cardíacas de la enfermedad son su manifestación más frecuente y su principal causa de muerte. La tripanosomosis americana está ahora presente en nuestro medio debido al creciente flujo migratorio desde países de Latinoamérica. El objetivo de este estudio es caracterizar las manifestaciones cardíacas de la enfermedad de Chagas entre la población latinoamericana que acude a una consulta de enfermedades tropicales en Barcelona.

Material y métodos: Se realizaron 292 serologías de cribado entre la población latinoamericana que acudió a la consulta entre Abril del 2004 y Diciembre del 2005. Se recogieron datos de edad, sexo, país y localidad de procedencia, permanencia en área rural y en casas de adobe y recepciones de productos sanguíneos. Se realizó anamnesis exhaustiva sobre alteraciones digestivas o cardiológicas en forma de síntomas de arritmia o insuficiencia cardíaca. A todos los pacientes se les realizó analítica básica, serología VIH, radiografía de tórax y electrocardiograma. En los pacientes que lo requerían se realizó ecocardiografía o estudio Holter de 24 horas.

Resultados: Ochenta y dos pacientes (28%) fueron serorreactivos para *Trypanosoma cruzi* de los cuales nueve (11%) presentaron cardiopatía. La media de edad fue de 40,3 años y 5 eran mujeres. Seis pacientes eran de Bolivia, dos de Brasil y un paciente de Argentina. Ninguno de ellos había recibido donaciones de sangre. Todos ellos habían residido en área rural durante al menos un año y el origen más probable de la infección era la vía vectorial. Una paciente presentó muerte súbita no recuperada como primera manifestación clínica de su miocardiopatía. Tres pacientes presentaron miocardiopatía dilatada con disfunción sistólica severa y disnea clase II/III (NYHA). Dos pacientes presentaron trastornos del ritmo asintomáticos. Tres pacientes presentaron disnea de esfuerzo leve con ligeros trastornos de la función miocárdica.

Conclusiones: La enfermedad de Chagas es una enfermedad importada presente en nuestro medio. Es posible que la presencia de alteraciones del ritmo cardíaco y de la función miocárdica en pacientes serorreactivos para *T. cruzi* sea debida a la enfermedad de Chagas. Se debe prestar atención esta patología en personas procedentes de áreas endémicas en especial si presentan trastornos cardiológicos.

302

FIEBRE Q EN EXTREMADURA: UNA INFECCIÓN EMERGENTE

A. Muñoz Sanz, A. Vera Tomé y F.F. Rodríguez Vidigal
Unidad de Patología Infecciosa. Hospital Universitario Infanta Cristina. Servicio Extremeño de Salud. Universidad de Extremadura. Badajoz.

Introducción y objetivos: La fiebre Q (infección por *Coxiella burnetii*) es una antropozoonosis prevalente de distribución mundial. En el ser humano se comporta como una infección multisistémica y puede estar infradiagnosticada en nuestro medio. Se describen las características epidemiológicas y el espectro clínico de la fiebre Q en un Área de Salud donde antes no se había descrito y se valoran las variaciones ocurridas en la última década.

Material y métodos: Estudio retrospectivo de 124 casos de fiebre Q diagnosticados en la Unidad de Patología Infecciosa del Hospital Universitario Infanta Cristina, entre junio de 1992 y mayo de 2005 (el 57% de los diagnósticos se hizo en las consultas externas, los restantes tras el ingreso hospitalario). Se analizaron datos demográficos, epidemiológicos, clínicos, serológicos y terapéuticos y se valoró la presencia de los factores relacionados con el ingreso.

Resultados: La edad media fue de 41 ± 16 años, predominaron los varones (relación 4:1), el 61% de los pacientes vivía en poblaciones de menos de 15.000 habitantes y el 47% tenían contacto profesional con animales de granja. La forma clínica de presentación más frecuente fue la fiebre sin focalidad (53%), seguida de la hepatitis (43%) y la neumonía (11%). La endocarditis se presentó en el 6% de los casos y se asoció a títulos más elevados de serología frente a *Coxiella burnetii* (p = 0,015). Los factores relacionados de un modo independiente con la necesidad de ingreso fueron: el diagnóstico a partir de 1999 (OR 12,2; IC95% 3,2-47,6), la presencia de neumonía (OR 4,1; IC95% 1,1- 15,9) y la hepatitis (OR 2,7; IC95% 1,2-6,3). Durante la segunda mitad del período de estudio hubo más diagnósticos, la duración de los síntomas previa al diagnóstico fue menor (p = 0,042) y se hospitalizó a una mayor proporción de pacientes (55% frente a 9%, p < 0,0001).

Conclusiones. 1. En nuestro medio, donde antes no se había descrito, la fiebre Q predomina en los varones, en el medio rural y se asocia con el contacto con ganado. 2. La forma de presentación clínica más frecuente es la fiebre sin focalidad infectológica, siendo escasa la neumonía. 3. El diagnóstico a partir de 1999, la neumonía y la hepatitis se relacionaron con la necesidad de ingreso hospitalario. 4. Durante los últimos años ha aumentado el diagnóstico de fiebre Q y los ingresos hospitalarios en nuestra área lo cual sugiere la posibilidad de una infección emergente.

303

EMERGENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILIN-RESISTENTE EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

A. Broseta¹, F. Chaves¹, M.T. Martínez Martínez², G. García Hernández² y J.R. Otero¹

¹Servicio de Microbiología, ²Unidad de Fibrosis Quística. Hospital 12 de Octubre.

Introducción: El incremento del número de aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilín-resistentes (SARM) en la

unidad de Fibrosis Quística del Hospital 12 de Octubre durante los últimos años nos ha llevado a estudiar las características microbiológicas y epidemiológicas de las infecciones por SARM en este tipo de pacientes.

Material y métodos: Se trata de un estudio retrospectivo en el que se analizaron los SARM aislados a partir de muestras de esputo procedentes de pacientes que acuden a la unidad de Fibrosis Quística y que comprende un periodo de tiempo de 3 años. Las historias clínicas fueron revisadas de acuerdo a un protocolo preestablecido. Los aislamientos de SARM se estudiaron mediante electroforesis en campo pulsante (ECP), tipificación del elemento SCCmec y determinación de la presencia del gen que codifica la leucocidina de Pantón-Valentine (LPV).

Resultados: De los 139 pacientes en seguimiento se obtuvieron un total de 27 cepas de SARM correspondientes a 12 pacientes distintos (8,6%), 5 varones (41,6%) y 7 mujeres (58,3%), de edades comprendidas entre 20 y 36 años. Mediante ECP se obtuvieron un total de 10 grupos clonales. Encontramos un clon predominante que afectó a 7 pacientes (58,3%). En 6 pacientes se dispuso de 2 o más aislamientos de SARM. En dos de ellos persistió el mismo clon a lo largo del tiempo y en 4 tuvieron infecciones por diferentes cepas de SARM. El elemento SCCmec IV fue el predominante (57,7%) seguido del SCCmec I (26,9%). Ninguna de las cepas estudiadas era productora de la toxina LPV. Al testar la sensibilidad antibiótica encontramos que un 81% de las cepas eran resistentes a Eritromicina, 54% a Clindamicina, 38% a Gentamicina, 38,5% a Ciprofloxacino y 4% a Cotrimoxazol. No se encontró ninguna cepa resistente a Mupirocina, Ac. Fusídico, Vancomicina o Rifampicina.

Conclusión: Se detecta un incremento en el número de casos de SARM en pacientes pertenecientes a la unidad de Fibrosis Quística de nuestro hospital desde el año 2002 fundamentalmente a expensas de un único clon. Es necesario extremar las medidas preventivas y de vigilancia para evitar la expansión de las cepas de SARM entre los pacientes con esta enfermedad.

304

BROTE DE HISTOPLASMOSIS IMPORTADA ATÍPICA PROCEDENTE DE ECUADOR

D. Alonso¹, J. Muñoz¹, E. Letang¹, M. Cuenca-Estrella², J. Ruiz¹ y J. Gascón¹

¹Sección de Medicina Tropical. Centro de Salud Internacional. Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, ²Laboratorio de Micología. Centro de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

Introducción y objetivos: La histoplasmosis es una infección sistémica causada por la inhalación de esporas del hongo *Histoplasma capsulatum*. Está ampliamente distribuida en América, siendo habitualmente asintomática entre la población autóctona. El aumento de los viajes a zonas endémicas, unido a una mayor alerta por parte de los profesionales de la salud ha motivado un incremento notable del número de casos diagnosticados en España. No obstante, el elevado porcentaje de casos asintomáticos, su clínica habitualmente inespecífica y la poca accesibilidad a pruebas diagnósticas confirmatorias hacen del diagnóstico de esta enfermedad una tarea difícil. Describimos un brote de histoplasmosis con manifestaciones reumatológicas en cuatro turistas españoles tras un viaje a Ecuador.

Descripción de casos y metodología: Se describen cuatro casos de histoplasmosis importada diagnosticadas en nuestro Dispensario de Medicina Tropical en septiembre 2005. El cuadro clínico se inició en la tercera semana del viaje y consistió en fiebre, escalofríos, astenia y artromialgias (4 pacientes), con aparición posterior de lesiones cutáneas compatibles con eritema nodoso (3 pacientes). Las cuatro pacientes eran inmunocompetentes. La historia epidemiológica evidenció exposición mantenida a aves de corral y sus excrementos (pernoctaron en chozas compartiendo espacio con ga-

llinas). Dos pacientes presentaron además tos seca e infiltrados radiológicos en la radiografía de tórax y una paciente presentó clínica y ECG compatible con pericarditis. La prueba de la histoplasmina y la serología (test de aglutinación con látex) fueron positivas en las cuatro pacientes y la detección de ADN mediante PCR en tiempo real fue positivo en una paciente. Se decidió tratamiento sintomático con reposo y AINES, con autolimitación de la clínica en aproximadamente un mes. En ningún caso se instauró tratamiento con itraconazol.

Conclusiones: La histoplasmosis es una enfermedad infradiagnosticada que debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de los procesos febriles en viajeros procedentes de áreas endémicas. Una historia epidemiológica detallada y un elevado índice de sospecha son claves para llegar al diagnóstico. Las técnicas de biología molecular pueden ser técnicas útiles en el diagnóstico de esta enfermedad. La presencia de manifestaciones reumatológicas acompañantes (especialmente artralgias y eritema nodoso) orientan a esta etiología.

305

INFECCIÓN POR VIRUS CHIKUNGUNYA EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DEL SÍNDROME FEBRIL INESPECÍFICO EN GUINEA ECUATORIAL

A.I. Negro¹, X. Collao^{1,2}, J. Cano³, A. Tenorio¹, A. Benito³ y M.P. Sánchez-Seco^{1,4}

¹Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Viricas Importadas, CNM, ISCIII, Madrid. ²Departamento de Virología, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ³Centro Nacional de Medicina Tropical, ISCIII, Madrid. ⁴Unidad de Alertas y Emergencia, CNM, ISCIII, Madrid.

Introducción: Entre los arbovirus considerados actualmente como patógenos emergentes o reemergentes se encuentra el virus Chikungunya (CHIKV) que pertenece a la familia Togaviridae, género *Alphavirus* y causa un cuadro clínico similar al del virus Dengue con fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y dolor articular principalmente. Se mantiene en un ciclo selvático y el hombre se infecta accidentalmente, sin embargo el nivel de viremia es lo suficientemente elevado como para no ser un huésped final y poder contribuir al mantenimiento de ciclos urbanos. Es un virus de origen africano cuya actividad en algunas islas del Océano Índico y ciertas zonas de África y Asia se ha visto incrementada recientemente, lo cual le ha convertido en un problema real de salud pública.

Objetivo: Buscar *Alphavirus* en pacientes de Guinea Ecuatorial para determinar su posible implicación en cuadros febriles.

Metodología: Se recolectaron 720 muestras de sangre de niños con síndrome febril en el Centro de Referencia para el control de Enfermedades Endémicas en Bata, Guinea Ecuatorial. La sangre se depositó en tubos que contenían un tampón de lisis con isotiocianato de guanidinio que preserva los ácidos nucleicos e inactiva la muestra facilitando su conservación y transporte. Tras la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó una técnica de amplificación genérica capaz de detectar cualquier alfavirus y se identificó el producto amplificado mediante secuenciación.

Resultados y discusión: Se obtuvieron resultados positivos en 8 muestras y tras ser secuenciadas se identificó CHIKV en todas ellas. Los resultados positivos fueron obtenidos al final de las dos estaciones lluviosas que tienen lugar en este país, coincidiendo con el período de mayor actividad de los vectores. En 4 de las muestras (50%) se detectó además presencia de *Plasmodium falciparum*.

Conclusión: Se describe por primera vez la circulación de CHIKV en Guinea Ecuatorial. Este virus debería ser considerado entre los agentes causales de cuadros febriles en este país y por tanto en el diagnóstico diferencial de estos cuadros en viajeros que regresan de esta región.

ENFERMEDAD DE CHAGAS IMPORTADA EN VALENCIA. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS

P. Segarra, M. García, V. Abril, T. Fraile¹, T. Gomis, S. Escrivá, J. Rodríguez¹, C. Parada² y E. Ortega

Unidad de Enfermedades Infecciosas-Salud Internacional. Hospital General Universitario, Valencia. ¹Sección de Serología. ²Banco de Sangre Comunidad Valenciana.

Objetivo: Analizar las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con Tripanosomiasis Americana en Valencia.

Pacientes y métodos: Estudio prospectivo de los pacientes diagnosticados de Enfermedad de Chagas entre enero y diciembre de 2005 en la Consulta de Salud Internacional del Hospital General de Valencia. Se realizó cribado serológico a las personas nacidas en zona endémica de E. de Chagas, o viajeros con riesgo de infección por T. cruzi así como hijos de madres chagásicas. El diagnóstico se realizó mediante tests serológicos comerciales: ELISA Recombinante (BioElisa-Chagas, Biokit SA), que se usó para cribado serológico, e IFI (MarDx Diagnostic). *Definición de caso:* Cualquier paciente con antecedentes epidemiológicos y dos o más tests diferentes positivos. Se realizó entrevista clínica, exploración física, ECG y RX de torax. A los pacientes sintomáticos o con alguna alteración en las exploraciones se les solicitó ecocardiograma, tránsito baritado y enema opaca.

Resultados: Hemos identificado diez casos, todos ellos inmigrantes latinoamericanos. Siete habían sido remitidos por el Banco de Sangre de la Comunidad Valenciana debido a un test ELISA positivo detectado en el cribado. La edad media fue 45,5 años (rango 27-66). Sexo: 7 mujeres y 3 varones. Siete procedían de Bolivia, 2 de Argentina y 1 de Chile. Se realizó PCR para T cruzi en 2 de los casos y fue positiva en uno. Nueve pacientes tenían formas crónicas indeterminadas y una padecía una forma mixta. Esta enferma refería estreñimiento, dolor torácico y palpitaciones; se detectaron extrasístoles ventriculares en el ECG si bien la RX de tórax y ecocardiograma fueron normales; el tránsito digestivo baritado mostró megaesófago con actividad motora irregular y dolico-colon.

Conclusiones: La mayoría de casos son asintomáticos, por lo que es preciso un alto índice de sospecha para establecer el diagnóstico. El control clínico de los pacientes con formas crónicas de E. de Chagas y el cribado sistemático de la sangre en los donantes procedentes de zonas endémicas es de suma importancia. La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad emergente en Europa a causa de los movimientos migratorios. Esta situación requiere una mejoría en el conocimiento acerca de la clínica y los métodos diagnósticos, especialmente en los Bancos de Sangre, así como la determinación de prioridades en prevención y necesidades asistenciales

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*: RELACIÓN ENTRE MUESTRAS CLÍNICAS Y AMBIENTALES

M. Coscollá¹, I. Escribano², M. Pascual Pobil³ y F. González-Candelas¹

¹Instituto Cavanilles, Univ. Valencia; ²Hosp. Virgen de los Lirios, Alcoy; ³Centro de Salud y Epidemiología, Benidorm.

Introducción y objetivos: La amplificación de muestras clínicas de *Legionella pneumophila* se suele realizar a partir de DNA extraído de un cultivo previo de la muestra respiratoria, pero éste es costoso y no siempre eficiente. Nos propusimos amplificar DNA procedente directamente de

muestras respiratorias sin pasar por cultivo, secuenciar y analizar la diversidad genética de muestras clínicas y compararla con la de muestras ambientales de un estudio previo.

Material y métodos: Extracción de DNA total de las 58 muestras respiratorias y de 14 cultivos de *Legionella*. Amplificación y secuenciación de algunos marcadores propuestos por el EWGLI, así como de regiones intergénicas del genoma de *L. pneumophila*. Las secuencias obtenidas se usaron para los análisis de diversidad genética y para obtener árboles filogenéticos por el método de máxima verosimilitud.

Resultados: El éxito en la amplificación y secuenciación de al menos dos regiones a partir de DNA procedente de esputo ha sido de un 40%. Por otra parte, el éxito en el cultivo de estas muestras había sido de un 21%. Las secuencias derivadas de ambos tipos de muestras, cultivadas y sin cultivar de un mismo paciente, coincidieron en los 8 casos en los que fue posible realizar la comparación. Todas las muestras derivadas de cultivo resultaron positivas para PCR. En cuatro casos, pese a que se había logrado un cultivo positivo, no fue posible obtener secuencias de la muestra respiratoria de la que procedían. Las secuencias obtenidas revelan diferencias entre las muestras analizadas, mostrando, en ocasiones, diferentes orígenes en pacientes cercanos en el lugar y en tiempo. Es más, algunas muestras están estrechamente relacionadas con muestras ambientales de un estudio previo.

Conclusiones: 1) La amplificación a partir de muestras respiratorias obtenidas directamente de los pacientes sin pasar por cultivo es factible y las secuencias derivadas coinciden con las de los cultivos en los casos en que se ha podido realizar la comparación. 2) La tasa de éxito en la amplificación de DNA y posterior secuenciación de muestras respiratorias es mayor que la de casos en que es posible obtener cultivos positivos a partir de esas mismas muestras, lo que abre la posibilidad de estudiar directamente las mismas mediante la secuenciación de genes y loci marcadores seleccionados por su variabilidad, facilidad de amplificación y grado de discriminación, entre otros factores de interés.

ELISA A-C6 (VISE) VERSUS ELFA (VT:>2,0) PARA EL CRIBADO SEROLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE LYME

I. López, I. Martínez, L. López y J. Pérez-Irezábal
Servicio de Microbiología. Hospital de Cruces, Baracaldo. Vizcaya.

Objetivo: Comparar 2 técnicas rápidas para el cribado serológico de pacientes con sospecha de E. de Lyme: Quick ELISA C6 Borrelia (Immunitics, LETI) y VIDAS Lyme Screen (ELFA IgG+IgM, Bio-Merieux), con valores de VT > 2,0.

Material y método: Durante el año 2004 se recibieron en el servicio de Microbiología de nuestro hospital (terciario, de 1.000 camas y área de cobertura de unos 200.000 habitantes) 722 muestras, pertenecientes a 677 pacientes, para despistaje serológico de Enfermedad de Lyme (EL); a todos ellos se les realiza de entrada la técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay, IgG+IgM, Bio-Merieux), con los resultados siguientes: positivo (ELFA VT > 1,0) 44 muestras y 6,1% del total, indeterminado (VT: 0,75-0,99) 27 muestras y 3,7%, y negativo (VT <0,75) el resto, 651 muestras, lo que supone el 90,2% de las determinaciones. A 56 muestras de suero, pertenecientes a 35 pacientes, se practica un inmunoblot (IB, Borrelia EcoLine, IgG o/y IgM, Immunoblot, Virotech.), seleccionadas en virtud de criterios clínicos y serológicos previos: 19 muestras (de 13 pacientes) con resultado del ELFA > 2,0 (VT) y 37 muestras (pertenecientes a 22 pacientes) con resultado del ELFA < 2,0 (9 muestras negativas, con VT < 0,75, 12 indeterminadas, VT: 0,75- 0,99 y 16 positivas pero

inferiores a 2,0, VT: 1,0-1,99). 10 pacientes fueron positivos (IB). A las 56 muestras comentadas, congeladas a -20°C, junto a otras 5 pertenecientes a 3 pacientes con IB positivo y EL actual (año 2003) se les realiza con posterioridad un ELISA para demostración de anticuerpos frente al péptido C6 (VIsE).

Resultados: 1. ELFA > 2,0: Muestras de 9 de 13 pacientes con resultado en el cribado de ELFA > 2,0 y 1 de los 22 con ELFA < 2,0 fueron positivas en IB (G o/y M) (S: 9/10, 90%; E: 21/22, 95%, respecto al IB). 2. ELISA a-C6: muestras de 8 pacientes de los 10 con IB positivo (del estudio común para las 2 técnicas) y de los 3 posteriores (con IB positivo del año 2003) mostraron reactividad sérica frente al péptido sintético C6 (a-C6, VIsE) (S: 8+3/10+3 = 11/13, 84,6%) e igualmente lo fueron las de 3 pacientes de los 25 con IB negativo (E: 22/25, 88%).

Conclusiones: 1. Ambas técnicas -ELFA con valores de VT > 2,0 y ELISA anti-C6- han mostrado ser muy válidas para el cribado de pacientes con sospecha clínica de E. de Lyme, permitiendo descartar sin más estudios un 85-95% de las muestras. 2. Es necesario repetir el examen, con 3 semanas de demora, como ya se ha comunicado reiteradamente, a los pacientes con clínica compatible de EL temprana (Eritema migratorio, neuropatía craneal) o/y resultados indeterminados para las técnicas comentadas.

309

ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *BARTONELLA* SPP. DIAGNOSTICADAS EN UN HOSPITAL GENERAL

I. Sanfeliu¹, E. Anton², V. Pineda³, J. Perez³, M.J. Merino¹, B. Font² y F. Segura²

¹Laboratorio Microbiología, UDIAT Centre Diagnòstic, ²Servicio de Enfermedades Infecciosas, ³Servicio Pediatría. Corporació Parc Taulí. Sabadell. Barcelona.

Introducción y objetivo: *Bartonella* spp. es el agente causal de la enfermedad por arañazo de gato (EAG) y de una serie de formas viscerales o sistémicas. El objetivo de nuestro estudio es describir las características de los pacientes con infección por *Bartonella* spp. atendidos en un hospital general.

Material y métodos: El estudio se realizó en el Hospital de Sabadell, que atiende a una población de 407.763 habitantes. Se analizaron las características de todos los pacientes con sospecha clínica de infección por *Bartonella* spp. y que presentaban serología positiva a *Bartonella* spp.. Se consideraron positivos los títulos > 1/128. La determinación de anticuerpos anti-*Bartonella* se realizó mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando antígeno comercializado (*Bartonella* IFA IgG Substrate Slide, Focus Diagnostics; USA). El periodo de estudio fue desde enero 1998 a enero de 2006.

Resultados: 29 pacientes cumplieron los criterios de inclusión. 16 niños (8 varones), menores de 15 años con una edad media de 8,2 años (3-14) y 13 adultos (10 varones), edad media 34,5 años (17-57). Todos los niños eran inmunocompetentes, trece referían historia de contacto con gatos. Once presentaban adenopatías localizadas, 4 de ellos con fiebre. En cinco se observaron manifestaciones atípicas tales como fiebre de origen desconocido, lesiones esplénicas, eritema nudooso o neumonía. Entre los pacientes adultos 4 estaban infectados por el VIH y 10 referían contacto con gatos. Diez casos presentaron adenopatías regionales y 8 fiebre o febrícula. Tres pacientes manifestaron una clínica atípica: rash, cefalea (meningoencefalitis) y lesiones nodulares cutáneas (angiomatosis bacilar).

Conclusiones: La mayor parte de infecciones por *Bartonella* spp. en nuestra área, tanto en niños como en adultos, se presenta como EAG, aunque otras formas clínicas no son infrecuentes. Un alto grado de sospecha clínica, el antecedente de contacto con gatos y el uso de tests serológicos específicos son fundamentales para su diagnóstico.

310

IMPORTANCIA DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES PARA LA DETECCIÓN POR PCR DE *BORRELIA BURGENDORFERI* EN *IXODES RICINUS*

A. Portillo, S. Santibáñez, L. Pérez-Martínez, V. Ibarra, J.R. Blanco, M. Sanz y J.A. Oteo

Área de Enfermedades Infecciosas. Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro- de La Rioja (Hospital de La Rioja).

Introducción: *Borrelia burgdorferi* sensu lato es el agente causal de la enfermedad de Lyme, una zoonosis endémica en ciertas áreas del norte de España que coinciden con la distribución de su vector, *Ixodes ricinus*. Conocer la prevalencia de infección por *Borrelia* en los vectores resulta útil para evaluar el riesgo de infección en humanos.

Objetivo: Analizar la utilidad de los cebadores BOLF y 16S3B, que amplifican un fragmento del gen ARNr 16S, para la detección por PCR de *B. burgdorferi* en *I. ricinus*.

Material y métodos: Un total de 13 *I. ricinus* recogidos de vacas en La Rioja fueron descontaminados con 70% etanol-0,2% yodo y agua destilada estéril. El ADN genómico se extrajo mediante lisis con hidróxido amónico 0,7M. Como diana de PCR se eligió un fragmento del ADNr 16S de *Borrelia*, empleando los cebadores BOLF: 5' CGCTGG-CAGTGCCTCTTAA 3' y 16S3B: 5' GCGGCTGCTGGCACG-TAATTAGC 3', previamente descritos. Las condiciones de PCR fueron: una desnaturalización de 3 min. a 94°C, 35 ciclos de 15 seg. a 94°C, 1 min. a 59°C y 1 min. a 72°C, y una extensión final de 5 min. a 72°C. Se utilizaron controles positivos (ADN de *Borrelia japonica*) y negativos. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambos sentidos. Las secuencias se compararon con las de la base de datos GenBank usando el programa BLAST (Nacional Centre for Biotechnology Information) y se alinearon con ALIGN (Centre National de Ressources Informatiques Appliquées à la Génomique).

Resultados: En tres de trece *I. ricinus* se amplificó un fragmento del tamaño esperado (491 pb). Las secuencias de nucleótidos fueron homólogas (100% identidad) a las del gen ARNr 16S de *Acinetobacter* sp. (DSN590; n° acceso en GenBank: X81659). La secuencia del control positivo fue idéntica a la de *B. japonica* (cepa HO14T; n° acceso en GenBank: L46696). Los fragmentos del gen ARNr 16S de *Acinetobacter* sp. y *B. japonica* presentaron un 68,6% de similitud. Con el resto de muestras y con los controles negativos no se obtuvieron bandas de PCR.

Conclusiones: La secuenciación de ADN es necesaria para confirmar la especificidad de los cebadores BOLF y 16S3B cuando se investiga por PCR la presencia de *B. burgdorferi* en *I. ricinus*.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a ayudas del Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo (G03/057 y PI051460).

311

INFECCIÓN EN HUMANOS POR *RICKETTSIA FELIS*. UN GRUPO DE CASOS DIAGNOSTICADOS POR PCR EN ESPAÑA

J.A. Oteo, A. Portillo, S. Santibáñez, J. R. Blanco, L. Pérez-Martínez, V. Ibarra y L. Metola

Área de Enfermedades Infecciosas. Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro- de La Rioja (Hospital de La Rioja).

Introducción: En los últimos años se han implicado nuevas especies de *Rickettsia* como agentes causales de infecciones humanas, gracias a técnicas como PCR o cultivo. *Rickettsia felis* se implicó en patología humana en 1994. Desde entonces, se han diagnosticado numerosos casos humanos, aunque pocos han sido confirmados.

Pacientes y métodos: En septiembre de 2005, dos pacientes acudieron a nuestro Hospital dos días después de visitar con su perro un bosque del noroeste de la Rioja (Alto de Piqueras). Ella presentaba fiebre, malestar, artralgia y un rash prurítico papular en extremidades inferiores, pecho y abdomen. El tenía el mismo cuadro clínico aunque sin fiebre. El perro estaba afebril; tenía fatiga, vómitos y diarrea. Los tres presentaban larvas de trombicúlidos (*Neotrombicula autumnalis*). La mujer y el perro habían sido picados por pulgas. Se recogieron muestras de sangre y suero de pacientes y suero del perro, que se testaron por inmunofluorescencia indirecta y ELISA (IgG) y por PCR frente a infección por *Bartonella*, anaplasmosis humana, borreliosis de Lyme, fiebre Q y rickettsiosis. Paralelamente, se investigó por PCR la presencia de rickettsiales en más de mil larvas de trombicúlidos recogidas en Piqueras. Los productos de PCR fueron secuenciados.

Resultados: Se hizo un diagnóstico presuntivo de trombiculiasis. A la paciente se le administró doxiciclina (200 mg/día) 10 días, recuperándose en 48 horas. El perro recibió terramicina y mejoró drásticamente. El paciente afebril no recibió antimicrobianos. En las muestras clínicas estudiadas se evidenció la presencia de *Rickettsia* sp. por amplificación de *ompA*, *ompB* y *gltA*. Las secuencias fueron 100% idénticas a *R. felis*. El resto de pruebas microbiológicas fueron negativas. En los trombicúlidos no se detectó *Bartonella* sp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdoferi*, *Coxiella burnetti* ni *Rickettsia* sp.

Conclusiones: Se ha detectado mediante PCR, por primera vez en nuestro país, la infección por *R. felis* en humanos. *R. felis* debe considerarse en el diagnóstico de rickettsiosis transmitidas por pulgas, incluso en pacientes sin rash o asintomáticos. El papel de trombicúlidos en la infección se desconoce, pero podrían facilitarla a través de heridas en la piel.

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a ayudas del Plan Riojano I+D+I, del Gobierno de La Rioja (ANGI 2004/17) y del Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo (G03/057).