

## ESTUDIOS DE LABORATORIO CON BAJO RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO APLICABLES EN ENFERMOS. UTILIZACIÓN DE LA PCR

### DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA POR PCR

Guillermo Prats, Nuria Margall y Mónica Majó.

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Cruz y San Pablo.

La meningitis bacteriana es una enfermedad grave del sistema nervioso central (SNC), causada por un conjunto de microorganismos cuya frecuencia varía según diversos factores, entre los que destacan la edad y localización geográfica. En nuestro ámbito, el agente causal más frecuente es *Neisseria meningitidis*, a continuación *Streptococcus pneumoniae* y, con una incidencia mucho más reducida, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, entre otros<sup>1</sup>.

Los actuales métodos de diagnóstico microbiológico de las meningitis bacterianas son poco sensibles y/o específicos. En los últimos años se han puesto a punto técnicas de diagnóstico molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de detectar de forma rápida la presencia de bacterias en diferentes tipos de muestras. En el caso de las meningitis bacterianas se han realizado estudios, en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre, por la técnica de PCR, para la detección de un único agente causal como *H.influenzae*, *N.meningitidis* o *S.pneumoniae*, respectivamente<sup>2-6</sup>. Para

el análisis de las meningitis meningocócicas en muestras de LCR, se han amplificado secuencias específicas de *N. meningitidis* presentes en el gen de la dihidropterato sintasa (*dhps*)<sup>4</sup> o la secuencia de inserción IS1106<sup>5</sup>, obteniéndose resultados de sensibilidad adecuados de hasta cinco unidades formadoras de colonias<sup>2</sup>.

En 1994, Leong y Greisen<sup>7</sup> publicaron la estrategia de amplificar una secuencia presente en la mayoría de bacterias (región del genoma bacteriano que codifica la subunidad 16S del RNA ribosómico), mediante iniciadores universales o consenso. Este sistema permite la detección de un amplio espectro de bacterias, entre las que se incluyen los agentes bacterianos que causan meningitis con más frecuencia. La identificación posterior del microorganismo se efectúa por hibridación de los fragmentos amplificados, con sondas internas a la región amplificada, y específicas para cada microorganismo, marcadas con isótopos radiactivos o no radiactivos. A partir de este trabajo, han surgido escasas publicaciones para la detección de meningococo en LCR y con series muy reducidas.

En nuestro laboratorio se ha efectuado un estudio preliminar empleando éste método, aunque con hibridación posterior de los amplificados con sondas marcadas con fluoresceína. Los resultados obtenidos han permitido incrementar en un 13% el diagnóstico microbiológico de los casos con sospecha de meningitis. Paralelamente, otros autores han

Correspondencia:  
Guillermo Prats  
Servicio de Microbiología.  
Hospital de la Santa Cruz y San Pablo.  
Avda Sant Antoni Maria Claret, 167  
08025 Barcelona  
Correo electrónico: 2175@hsp.santpau.es  
Teléfono: 93 2919069

utilizado la técnica de amplificación de Leong y Greisen y la hibridación posterior con sondas específicas mediante un sistema de enzimoimmunoanálisis (Gen-Eti-K DEIA, Sorin Biomédica) con resultados de sensibilidad similares.

Más recientemente, se ha aplicado la técnica de PCR para la identificación directa de los serotipos B o C de meningococo en LCR, mediante la amplificación del gen de la sialiltransferasa<sup>8</sup>. La tipificación se efectúa, bien por digestión posterior del producto o por hibridación de los amplificados marcados con digoxigenina, con sondas de captura específicas y sistema de detección inmunoenzimático (PCR-ELISA). Estos métodos deben ser valorados con series clínicas más exhaustivas antes de incorporarse al diagnóstico microbiológico de rutina.

La principal ventaja de la PCR, su sensibilidad, es también uno de sus principales inconvenientes; es decir, la posibilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Este peligro puede minimizarse con el empleo de áreas separadas antes y después de la amplificación y una manipulación técnica rigurosa. Es por ello que éstos métodos, dada la trascendencia del diagnóstico de la meningitis meningocócica, deben efectuarse en laboratorios que dispongan de personal especializado y de una infraestructura adecuada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Departament de Sanitat i Seguretat Social (Generalitat de Catalunya). Resumen de los microorganismos declarados al SNMC durante el año 1996. Bull Epidemiol Catalunya 1998; XIX: 51-52.
2. Van Ketel RJ, de Wever B and van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol 1990; 33: 271-276.
3. Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, Forbes KJ. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. Epidemiol Infect 1995; 114: 93-103.
4. Kristiansen BE, Ask E, Jenkins A, Fermer C, Rådstrøm P, Skøld O. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 1991; 337: 1568-1569.
5. Ni H, Knight A, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. Lancet 1992; 340: 1432-1434.
6. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 596-601.
7. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A and Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1994; 32: 335-351.
8. Borrow R, Claus H, Guiver M, Smart L, Jones DM, Kaczmarski EB, Frosch M and Fox AJ. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by sialyltransferase (siaD) PCR ELISA. Epidemiol Infect 1997; 118: 111-117.