

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

UTILIZACIÓN DE LA PCR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

Sonsoles Berrón Morato y Julio A Vázquez Moreno.

Laboratorio de Referencia de Meningococos. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III.

Tras las campañas de vacunación masivas frente a meningitis meningocócica A+C, la única posibilidad de evaluar con una precisión razonable la eficacia de las mismas es combinar la realización de estudios de inmunogenicidad junto con los de eficacia clínica¹. Desafortunadamente, es muy frecuente un alto porcentaje de casos de meningitis bacterianas sin filiación etiológica, lo que dificulta enormemente la evaluación de la eficacia clínica de la vacunación. Estas dificultades, no pueden ser resueltas solamente con una mejora en los porcentajes de filiación etiológica, lo que se conseguiría con alguno de los protocolos de PCR descritos², ya que no se obtiene información sobre el serogrupo de la cepa de meningococo implicada en la producción del caso.

En este sentido, Borrow y cols.³ describieron en 1997 un protocolo de PCR que en un primer paso detecta la posible presencia de *N. meningitidis* y, posteriormente identifica si se trata de un meningococo de serogrupo B o C. En un primer paso, la muestra, que preferiblemente debe ser líquido cefalorraquídeo, es sometida a dos protocolos de amplificación: uno que amplifica la secuencia de inserción *IS1106* (de la que existen alrededor de 6 copias en el genoma completo) y otro que am-

plifica una región del gen *CtrA*, implicado en el transporte activo a través de la cápsula. Si alguna ó las dos amplificaciones resultan positivas, se procede a un segundo proceso de amplificación, esta vez con otros dos protocolos: uno que amplifica el gen *Siad B* (gen que codifica para la incorporación de ácido siálico en la cápsula de polisacárido B) y otro que amplifica el gen *Siad C* (correspondiente al polisacárido C), con lo que obtendremos información sobre el serogrupo.

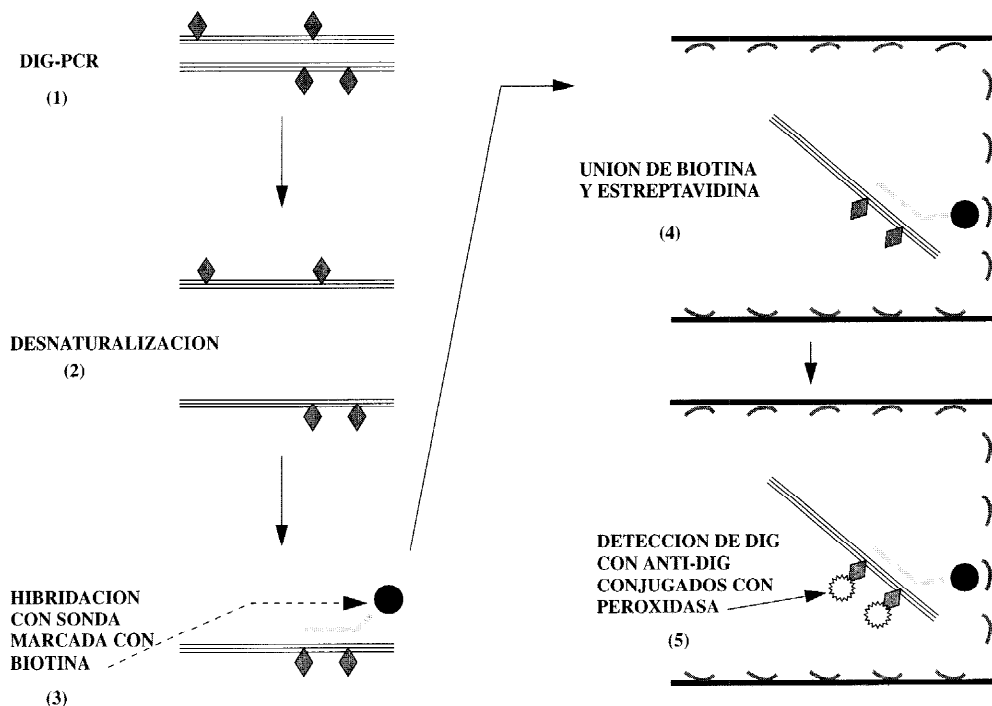
La detección de todos los productos de amplificación se realiza mediante un ELISA con sonda de captura, lo que proporciona una especificidad del 100%³ (figura 1). Los niveles de sensibilidad no son óptimos y dependen mucho del tipo de muestra con la que se trabaja: 80-85% en LCR, 60-65% en sangre y tan sólo un 30% cuando se trata de suero. No obstante, se ha descrito un protocolo modificado con el que parece mejorarse en gran medida la sensibilidad obtenida con suero⁴, aunque esto debe ser más ampliamente evaluado.

El protocolo descrito incluye la utilización de Uracil-N-glicosilasa, que permite eliminar la contaminación con amplificadores provenientes de anteriores ciclos de amplificación: el enzima degrada el ADN que lleva dUTPs incorporados en lugar de los dTTPs del «ADN natural». Esto va a impedir la aparición de falsos positivos por la mencionada contaminación, muy frecuente en la utilización de esta metodología para la detección de material genético.

Correspondencia:
Julio Vázquez Moreno
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda
28220 Madrid

Figura 1

Esquema del enzimoimmunoensayo para la detección de los productos de amplificación en la detección y caracterización de *Neisseria meningitidis*



Así pues, el futuro de la detección de *Neisseria meningitidis* pasa por la detección de su ADN en muestras clínicas, aunque el cultivo debe seguir siendo el método de elección. En estos momentos ya hay algún protocolo en evaluación para realizar el tipado y subtipado (de gran importancia en el seguimiento de la situación epidémica, como ha quedado recientemente puesto de manifiesto), pero la susceptibilidad frente a antimicrobianos no podría ser evaluada si en el futuro no contáramos más que con la detección del ADN de la bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, et al. Standardization and multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. Clin Diag Labor Immunol, 1997; 4(2): 156-167.
2. Rådström P, Bäckman A, Qian N, Kragshjerg P, Pålsson C, Olcén P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. J Clin Microbiol 1994; 32(11): 2738-2744.
3. Borrow R, Claus H, Guiver M et al. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase (*siaD*) PCR Elisa. Epidemiol Infection 1997; 118: 111-117.
4. Newcombe J, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. J Clin Microbiol 1996; 34(7):1637-40.