

**Métodos:** Se han estudiado 45 muestras (10 LCR, 15 heces y 20 faríngeos) de 20 enfermos con meningitis linfocitaria aguda.

**Cultivo tradicional:** De cada muestra se inocularon 0,2 ml en células Vero, RD, MRC-5 y Hep-2; los enterovirus se identificaron por IFI con monoclonales específicos de género (clon 5-D8/1 de DAKO) tras detección de efecto citopático en alguna de las líneas celulares. Posteriormente se tiparon por IFI (Echovirus antibody set y Coxsackie antibody set de Chemicon).

**Técnica de SV:** Se inocularon 0,2 ml de muestra por centrifugación en 2 tubos de fondo plano con cultivos RD y 2 tubos con MRC-5, realizándose IFI a las 48 h para detectar enterovirus.

**Resultados:** Por *cultivo tradicional* se aisló enterovirus en 33 muestras (73,3%) (7 LCR, 15 faríngeos y 11 heces) de 15 enfermos (en 5 enfermos se aisló ECHO 30, en 2 ECHO 6, en 2 Coxsackie B5, en 1 Coxsackie A9 y en 5 no se pudo tipar el virus); 28 crecieron en RD y MRC-5, 3 sólo en RD. Ninguna muestra fue positiva por SV y negativa en cultivo tradicional. Por la técnica de SV con MRC-5 fueron positivas 15 muestras (45% del total de positivos) y por SV con RD 31 (94%); no hubo positivas en SV con MRC-5 y negativas con RD. En las muestras detectadas por ambos sistemas la media de focos fluorescentes fue siempre superior con RD (5 a 20 veces más focos por campo de 40).

**Conclusiones:** La técnica de shell-vial usando cultivo de RD permite el diagnóstico rápido de las meningitis por enterovirus. La línea celular MRC-5 puede ser útil para el cultivo tradicional, pero es poco sensible para efectuar un diagnóstico mediante shell-vial.

## 448

### RENDIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR EN EL AISLAMIENTO DE ENTEROVIRUS

I. de Benito, M.E. Cano y M.V. Sanjuan

*Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.*

El cultivo celular es el método de referencia para el diagnóstico en el laboratorio de enterovirus, existiendo varias líneas celulares para su aislamiento con diferente sensibilidad según el subgrupo de enterovirus.

**Objetivo:** Evaluar la eficacia de distintas líneas celulares en el aislamiento de enterovirus y comparar el método de shell-vial frente al cultivo convencional.

**Material y métodos:** Estudiamos retrospectivamente 81 muestras con resultado positivo para enterovirus (tipadas como echovirus), 47 de LCR y 34 de tracto respiratorio superior (TRS). Las muestras fueron inoculadas en células MRC5 por el método de cultivo convencional y en MRC5, Hep-2, RD, y BGM por el método de shell-vial.

**Resultados:** De las líneas utilizadas para el método de shell-vial: 43 muestras de 81 (53%) fueron positivas para MRC5, 36 (44,4%) en RD, 29 (35,8%) en Hep-2 y 15 (18,5%) en BGM. Los resultados obtenidos por cultivo convencional en MRC5 fueron de 75 (92,5%) muestras positivas. Del total de las 81 muestras positivas, 77 (95%) se diagnosticaron sólo con la línea celular MRC5, empleando conjuntamente los dos métodos de cultivo.

**Conclusiones:** 1) En el caso de los echovirus aislados por el método de shell-vial, observamos un mayor porcentaje de aislamientos en MRC5 frente al resto de líneas celulares, pero esta diferencia no justifica prescindir de los otros tipos de células para el diagnóstico de enterovirus por este método. 2) Comparando los resultados obtenidos por el método de cultivo convencional frente al shell-vial, en células MRC5, se deduce claramente la buena rentabilidad del cultivo convencional. 3) La alta proporción de enterovirus aislados únicamente con MRC5 indica que esta línea celular puede ser de gran utilidad en laboratorios que solo puedan disponer de una clase de células.

## 449

### EXPERIENCIA CON LA LÍNEA CELULAR A-549 PARA EL AISLAMIENTO PRIMARIO DE VIRUS COXSACKIE B

I. Martínez, C. Prieto, S. Maldonado, M.J. Babiano, G. Trallero, D. Folgueira y J.R. Otero

*Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre y CNM, Majadahonda. Madrid.*

**Objetivos:** Evaluar la experiencia adquirida con el uso de la línea celular continua A-549 (derivada de adenocarcinoma humano de pulmón) para el aislamiento primario de virus Coxsackie B, comparándola prospectivamente con la línea BGM (derivada de células de riñón de mono verde).

**Métodos:** Entre abril de 1998 y junio de 1999, las torundas faríngeas enviadas al laboratorio de Virología fueron inoculadas en las líneas celulares MRC-5 (Laboratorios Vircell. Granada, España) y A-549 (American Type Culture Collection ATCC-CCL 185) en tubos. Los aislamientos de Enterovirus (EV) obtenidos fueron tipados por seroneutralización convencional. Durante una fase del estudio, se añadió un tercer tubo con células BGM (Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda, Madrid).

**Resultados:** En el período de estudio se recuperaron 171 aislamientos de EV. De ellos, 56 (32,7%) mostraron efecto citopático (ECP) sólo en A-549 (Grupo I); 48 (28%) sólo en MRC-5 (Grupo II); y 67 (39%) en ambas líneas celulares. Dentro del grupo I, la mayoría de los aislamientos (48 de 56, 85,7%) fueron Virus Coxsackie B pertenecientes a cuatro serotipos, B1, B2, B4 y B6. Durante el período en que A-549 y BGM fueron comparadas prospectivamente, se obtuvieron 90 aislamientos de EV de 746 muestras procesadas (12%). Todos los EV que crecieron en A-549 pero no en MRC5 (n = 20, 22%) también mostraron ECP en células BGM, siendo todos identificados como virus Coxsackie B. El ECP fue detectado aproximadamente el mismo día en ambas líneas.

**Conclusiones:** En este estudio, la línea celular A-549 se ha mostrado útil para el aislamiento primario de virus Coxsackie B, con resultados comparables a los obtenidos con BGM. La detección de ECP de EV en A-549 pero no en MRC-5 identificó virus Coxsackie B en la mayoría de casos. Por otra parte, A-549 puede proporcionar una mayor utilidad en el laboratorio para aislamiento de otros virus de importancia clínica.

## 450

### DETECCIÓN DEL VIRUS INFLUENZA MEDIANTE CULTIVO EN SHELL-VIAL Y RT-PCR EN GIPUZKOA

M. Montes, D. Vicente, G. Cilla, A. González y L. Piñeiro

*Servicio de Microbiología, Hospital Donostia, San Sebastián.*

**Introducción:** El cultivo celular es la técnica de referencia para la identificación del virus Influenza (VI). El objetivo de este trabajo es comparar los resultados del cultivo del virus Influenza en shell-vial con los de una nested PCR múltiple en un laboratorio perteneciente a la red nacional de vigilancia de la gripe.

**Métodos:** Durante las dos últimas temporadas invernales investigamos la presencia del VI en 391 frotis faríngeos (248 adultos y 143 pediátricos) enviados por médicos de la red centinela. Para el cultivo en shell-vial se sembraron 2 viales con células MDCK y 2 con A-549. Se realizó una RT-PCR múltiple con RNA extraído con Trizol-cloroformo. Se utilizaron los iniciadores descritos por Stockton et al (J Clin Microbiol 1998;36:2990-5) para detección de Influenza AH1, AH3, Influenza B, VRS tipo A y VRS tipo B.

**Resultados:** Se detectó VI en 124/391 (31,7%) de las muestras, siendo 115 tipo A (52 H1 y 59 H3) y 9 tipo B. La PCR detectó 120/124 (96,8%), mientras que el cultivo detectó 94/124 (75,8%).

**Conclusiones:** La PCR fue más sensible que el cultivo, además permitió conocer el subtipo circulante.