

nes de heridas causadas por mordedura de cerdos¹. *Leclercia adecarboxylata* es una enterobacteria poco habitual que puede encontrarse en agua y alimentos, aunque también puede aislarse de muestras humanas².

Presentamos el caso de una infección por ambos microorganismos.

Se trata de un varón de 58 años, trabajador del campo y en contacto con animales, que acudió a urgencias por haberle mordido un cerdo, presentando fractura de cuello del segundo metacarpiano derecho; se procedió a una cura local con drenaje del exudado que presentaba la lesión, remitiéndose dicho material al laboratorio de microbiología. El material procedente de la lesión se sembró en placas de agar sangre y agar chocolate, observándose a las 24 horas el crecimiento de 2 tipos de colonias correspondientes a bacilos gramnegativos, que se separaron en placa de agar de McConkey, obteniéndose colonias lactosa-negativas y lactosa-positivas. Se realizó identificación de ambos gérmenes con el sistema automatizado MicroScan WalkAway (Baxter), el panel Negative Combo 6I, y fueron identificados como *Pasteurella aerogenes* y *Leclercia adecarboxylata*, ambos con un 99,9% de probabilidades. Se realizó confirmación de la identificación mediante los sistemas API 20NE y API 20E, respectivamente, y con el sistema informatizado APILAB se obtuvieron los mismos gérmenes.

Pasteurella aerogenes fue el nombre propuesto por McAllister y Carter en 1974 para una bacteria gramnegativa aislada del intestino de cerdos con diversas enfermedades. Crece bien en agar de McConkey, es oxidasa, ureasa, nitrato y ornitín descarboxilasa-positiva, siendo indol-negativa. Puede producir gas de glucosa, y fermenta varios azúcares³.

Leclercia adecarboxylata fue descrita por Leclerc en 1962 como *Escherichia adecarboxylata*, siendo una bacteria productora de indol y carente de descarboxilasas, denominándose más tarde, a partir de estudios de hibridación y taxonomía, *Leclercia adecarboxylata*. Es Voges-Proskauer-negativa, no utiliza el citrato; utiliza el malonato y no fermenta el sorbitol. Es sensible a gran número de antibióticos⁴.

Hemos encontrado escasas referencias en la bibliografía relativas a *P. aerogenes*, dos de ellas relacionadas con mordeduras de cerdos^{5,6}. Barnham realizó un estudio de estas infecciones, informando del primer caso de infección por *P. aerogenes* en Inglaterra en una paciente que había sido mordida por un jabalí. Los patógenos que encontró en el pus de la herida fueron *P. aero-*

genes, *Proteus* sp., *E. coli* y *S. equisimilis* en cultivo mixto. Por otra parte, se ha sugerido la posible transmisión vertical de madre a feto en una trabajadora de una granja de cerdos que tuvo un aborto espontáneo en la semana 31 de embarazo⁷.

Respecto a *L. adecarboxylata*, revisando la base de datos MEDLINE sólo hemos encontrado una referencia (enero de 1994) correspondiente a Daza et al, que la aislaron en hemocultivos procedentes de un enfermo cirrótico⁴.

Eugenio Garduño, Rosa Sánchez,
Rosario Sánchez, Elena Belón,
Leopoldo Lucio, Paloma Martín
y Javier Blanco
Sección de Microbiología.
Hospital Infanta Cristina. Badajoz.

Bibliografía

- Pickett MJ, Hollis DG, Bottone EJ. Miscellaneous Gram-negative Bacteria. En: Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology 5ª ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991; 425.
- Farmer III JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. En: Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology, 5ª ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1991; 378.
- Weaver RE, Hollis DG, Bottone EJ. Bacterias fermentativas gramnegativas y *Francisella tularensis*. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, eds. Manual de Microbiología Clínica, 4ª ed. Buenos Aires: Interamericana 1989; 412.
- Daza RM, Iborra J, Alonso N, Vera I. Aislamiento de *Leclercia adecarboxylata* en paciente cirrótico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994; 11: 53.
- Barnham M. Pig bite injuries and infection: report of seven human cases. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 641-645.
- Lester A, Gerner-Smidt P, Garnh-Hansen B, Sogaard P, Schmidt J, Frederiksen W. Phenotypic characters and ribotyping of *Pasteurella aerogenes* from different sources. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 279 (1): 75-82.
- Thorsen P, Moller BR, Arpi M, Bremmelgaard A, Frederiksen W. *Pasteurella aerogenes* isolated from stillbirth and mother. *Lancet* 1994; 343: 485-486.

Subtipificación de cepas del virus Influenza A por la técnica rápida shell-vial (MDCK)

Sr. Director: El virus Influenza A es el agente causante de los brotes epidémicos anuales de gripe que afectan a la población mundial en los periodos invernales. Debido a ello es preciso determinar anualmente la naturaleza

antigénica de la cepa predominante para poder preparar una vacuna eficaz frente a esta enfermedad¹. Los diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que en la temporada 1993-1994 los subtipos de las cepas causantes de gripe en nuestra área geográfica fueron Influenza A/Shangdong/9/93 (H3N2) e Influenza A/Singapore/6/86 (H1N1).

Para poder establecer las características antigénicas de las nuevas cepas que surgen es preciso realizar un minucioso estudio que determine su pertenencia a un determinado tipo y subtipo antigénico². La tipificación se realiza en función de las características antigénicas de la nucleoproteína y las proteínas de matrix; mientras que la subtipificación del virus Influenza A se realiza estudiando las características antigénicas de la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA)^{2,3}. Este estudio normalmente se realiza mediante técnicas de inhibición de la hemaglutinación con sueros específicos obtenidos de diferentes animales. Para ello, sin embargo, es preciso realizar varios pases del virus en embriones de pollo o cultivos celulares hasta obtener una elevada actividad hemaglutinante. Todo ello hace que este método sea lento y laborioso y solamente pueda realizarse en algunos centros de referencia.

Recientemente Ziegler et al³ han descrito un sistema rápido basado en el cultivo de la cepa vírica por el método shell-vial en la línea celular MDCK que permite simplificar y acortar extraordinariamente el proceso de tipificación epidemiológica. Aprovechando la epidemia invernal de infecciones víricas respiratorias que afectan a la población infantil, fundamentalmente como bronquiolitis o bronquitis, hemos aislado en nuestro laboratorio, entre los meses de enero y abril de 1995, 10 cepas identificadas como virus Influenza A. Con ellas hemos realizado la subtipificación para establecer su pertenencia a la cepa epidémica prevalente.

Las cepas del virus Influenza A se han aislado siguiendo el protocolo de aislamiento viral para virus respiratorios. Las diferentes muestras clínicas, preferentemente aspirados nasofaríngeos han sido sembradas en dos shell-vials de la línea celular MDCK (Vircell, Ingelheim Diagnostica), además de las líneas Hep-2 y LLC-MK2^{4,5}. Las muestras se han centrifugado a 700 g durante 45 minutos y tras un período de absorción a 36 °C se ha sustituido la muestra por medio de mantenimiento. Los viales se han incubado 3 días a 36 °C tras lo cual se han fijado y revelado con el anticuerpo monoclonal anti-Influenza A (clon IA 52; Monofluokit Influenza, Pasteur). La positividad de

TABLA 1. Resultados obtenidos en la subtipificación de cepas del virus Influenza A por la técnica shell-vial

Anticuerpos monoclonales		Subtipo	Cepas (%)
HA1-71	HA2-76		
+	+	H3	8 (89)
-	+	H1	0
-	-	-	1 (11)*

* Subtipo no determinado.

éstas se ha establecido por la presencia de células con fluorescencia citoplasmática granular. Las cepas han sido conservadas a -75 °C hasta su utilización posterior.

Para la técnica de la subtipificación las cepas se han resembrado en tres viales de la línea celular MDCK (shell-vial) e incubados durante 3 días a 36 °C. Tras su fijación una de las monocapas se ha revelado con el clon IA 52 (Monofluokit Influenza) y las otras dos con los monoclonales HA1-71 y HA2-76 a la dilución 1:100, obtenidos por inmunización de ratones con los subfragmentos desnaturalizados HA1 y HA2 del virus Influenza A/Victoria/3/75 (cedidos gentilmente por la Dra. A. Sánchez-Fauquier, CNMVI Majadahonda, Madrid)^{6,7}. La positividad frente a los dos monoclonales HA1-71 y HA2-76 permite establecer la pertenencia de una cepa al subtipo H3, mientras que la positividad sólo frente al HA2-76 la clasifica como subtipo H1. Cuando una cepa no da positividad con ninguno de estos monoclonales no significa siempre que la cepa no pertenezca a estos subtipos, sino que es preciso utilizar la metodología clásica (inhibición de la hemaglutinación) para poder realizar la subtipificación definitiva.

De las 10 cepas de Influenza A aisladas en pacientes con bronquiolitis, sólo han podido subtipificarse nueve de ellas, debido a la pérdida de una cepa en el proceso de congelación. En la tabla 1 se exponen los resultados obtenidos con la técnica shell-vial. El 89% de las cepas corresponden al subtipo H3 y una cepa no dio reacción con ninguno de los monoclonales utilizados.

En el estudio realizado por Ziegler et al³ obtienen durante el período 1988-1993 un predominio del subtipo H3 (78,4%) frente a H1 en las cepas aisladas en diferentes brotes epidémicos. Al analizar 20 muestras clínicas observan, así mismo, un predominio del subtipo H3 (60%). En nuestro caso y sobre 9 cepas hemos obtenido un predominio absoluto del subtipo H3.

Coincidimos con los autores que la técnica de subtipificación mediante cultivo rápido shell-vial permite obtener datos antigénicos de las cepas aisladas con utilidad epidemiológica. Uno de los problemas de la técnica puede ser el

bajo título infectivo de la cepa de modo que se obtengan pocos focos infectivos en el vial control. En este caso y debido a que la subtipificación no da el mismo número de imágenes fluorescentes que el vial control podemos presentar dificultades de interpretación de los resultados. En nuestro caso siempre que aislamos una cepa de algún virus respiratorio realizamos un par de pases sobre su línea celular de modo que los viales congelados poseen un elevado título infectivo. Con ello se obtienen suficientes focos fluorescentes en los viales de la subtipificación que facilitan enormemente la lectura.

La técnica de subtipificación por el método shell-vial es, pues, un método sencillo, fácil y rápido que puede realizarse en cualquier laboratorio de virología sobre las cepas del virus Influenza A aisladas en muestras clínicas. Con ello podrá contribuirse a un mejor conocimiento epidemiológico de la prevalencia y distribución de las cepas infectivas de este virus en los brotes invernales y la utilidad real de los programas de vacunación.

Jordi Reina, María Jesús Ros,
Isabel Blanco y María Munar
Unidad de Virología.
Servicio de Microbiología Clínica.
Hospital Universitario Son Dureta.
Palma de Mallorca.

Bibliografía

1. Kendal AP, Skehel JJ, Pereira MS. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control, 1982.
2. Döller PC, Döller G, Gerth HJ. Subtype-specific information of influenza virus in cell cultures with FITC labeled egg yolk antibodies. Med Microbiol Immunol 1987; 176: 27-35.
3. Ziegler T, Hall H, Sánchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type- and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. J Clin Microbiol 1995; 33: 318-321.
4. Schrim J, Luijt DS, Pastoor GW, Mandema JM, Schröder FP. Rapid detection of respiratory viruses using mixtures of monoclonal antibodies on shell vial cultures. J Med Virol 1992; 38: 147-151.

5. Matthey S, Nicholson D, Ruhs S, Alden B, Knock M, Schultz K et al. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1992; 30: 540-544.
6. Sánchez-Fauquier A, Villanueva N, Melero JA. Isolation of cross-reactive, subtype-specific monoclonal antibodies against influenza virus HA1 and HA2 hemagglutinin subunits. Arch Virol 1987; 97: 251-265.
7. Sánchez-Fauquier A, Guillen M, Martin J, Kendal AP, Melero JA. Conservation of epitopes recognized by monoclonal antibodies against the separated subunits of influenza hemagglutinin among type A viruses of the same and different subtypes. Arch Virol 1991; 116: 285-293.

Bacteriemia por *Neisseria subflava* y ascitis neutrocítica en una paciente con cirrosis hepática

Sr. Director: *Neisseria subflava* es un diplococo gramnegativo del género *Neisseria*, comensal del tracto respiratorio superior que, ocasionalmente, se ha visto implicado en el desarrollo de infecciones graves, como endoftalmítis¹, meningitis¹, endocarditis² y artritis³. Además se han descrito aislamientos en sangre¹ o en líquido de diálisis peritoneal¹ con ausencia de infección focal. Presentamos el caso de una paciente con ascitis neutrocítica con cultivo negativo (ANCN) y aislamiento de *N. subflava* en los hemocultivos.

Mujer de 69 años con antecedentes de infección por virus de la hepatitis C y cirrosis hepática en estadio Child C. Consultó por un cuadro de una semana de evolución de distensión abdominal y desorientación temporoespacial. No refería antecedentes de manipulación orodental. En la exploración física se apreciaba una paciente apirética, con estigmas de hepatopatía crónica, hepatosplenomegalia, semiología de ascitis moderada, obnubilación y asterixis. En la analítica destacaba: creatinina, 150 µmol/l; sodio, 133 mmol/l; potasio, 4,1 mmol/l; hemoglobina, 5,2 mmol/l; hematócrito, 25%; VCM, 86 fL; leucocitos, 14,1 x 10⁹/l (84% segmentados); albúmina, 20,5 g/l; tiempo de protrombina de 46%. Se practicó una paracentesis de la que se obtuvo un líquido ascítico de aspecto cetrino cuyo estudio analítico mostró: glucosa, 7,27 mmol/l; proteínas, 6 g/l; amilasa, 0,08 µkat/l; ADA, 7 U/l; LDH, 1,11 µkat/l; células 3,3 x 10⁶/l (80% polimorfonucleares). El cultivo en medios convencionales fue negativo y el examen citológico no mostró la existencia de células neoplásicas. En dos hemocultivos se aisló *N. subflava*. La identificación de la bacteria se realizó con el sistema AMS-Vitek (tarjetas NHI) y el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos con la técnica Kir-