

APLICACION DE METODOS MOLECULARES EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Bioq. María Elena Venuta, Dr. Horacio A. Lopardo

INTRODUCCION

El diagnóstico precoz y preciso de los agentes causales de las enfermedades infecciosas produce un impacto de trascendencia en la disminución de la morbimortalidad y en los costos asociados a las mismas.

Las técnicas de Biología Molecular vienen a sumarse a los métodos corrientemente disponibles en el laboratorio de Microbiología aportando la ventaja de su mayor sensibilidad y especificidad. En algunos casos en que la demora de los métodos tradicionales en llegar a un diagnóstico es muy grande, incluso pueden acortar sensiblemente estos tiempos.

Para el diagnóstico de la mayoría de los patógenos bacterianos, cualquier ventaja de la aplicación de las técnicas de Biología Molecular está excedida por la facilidad con la que se pueden cultivar los microorganismos en forma económica y rápida, determinar su identidad y su patrón de sensibilidad a los antibióticos. Sin embargo, hay excepciones importantes en las cuales las técnicas moleculares han revolucionado el diagnóstico de laboratorio y es justamente en los casos en que los métodos convencionales no son lo suficientemente sensibles o rápidos. Por ésto se ha convertido en el método de elección o *gold-standard* para el diagnóstico de muchos agentes infecciosos en las instancias que se señalan en la Tabla 1.

Por otra parte, existen métodos moleculares que permiten discriminar entre cepas no relacionadas genéticamente pero pertenecientes a la misma especie e incluso al mismo serotipo, estableciendo criterios de "no identidad". Esto facilita el estudio de poblaciones bacterianas y su dinámica de diseminación en el hospital o en la comunidad, constituyendo así una herramienta de gran importancia para el análisis epidemiológico de las enfermedades infecciosas.

TABLA 1: CASOS EN QUE RESULTA CONVENIENTE EL USO DE METODOS MOLECULARES

<ul style="list-style-type: none">• Cuando el aislamiento por cultivo ofrece muy baja sensibilidad
<ul style="list-style-type: none">- Microorganismos de crecimiento dificultoso o lento (<i>Bordetella</i> spp., <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)- Microorganismos que no desarrollan en medios artificiales y requieren de líneas celulares (<i>Chlamydia trachomatis</i>, <i>Chlamydia</i> spp., Herpes simplex virus, Citomegalovirus)- Microorganismos que no pueden cultivarse (HCV)- Microorganismos cuyo cultivo resulta peligroso (<i>Chlamydia psittaci</i>, viruela, coronavirus relacionados al SARS)
<ul style="list-style-type: none">• Cuando la interpretación de los ensayos serológicos resulta confusa por su baja sensibilidad y/o especificidad
<ul style="list-style-type: none">• Cuando los ensayos serológicos resultan lentos por la necesidad de obtener muestras pareadas (fase aguda y convalescente)

Sin duda el mayor impacto de la Biología Molecular ha sido en este campo epidemiológico, con el perfeccionamiento de nuevos sistemas de tipificación basados en el ADN. Ellos han contribuido a proporcionar las bases sobre las cuales la infección puede ser prevenida mediante la aplicación de programas de vacunación o procedimientos de control de infecciones^{1,2}. Estas tecnologías antes estaban reservadas a laboratorios de investigación o referencia por su complejidad y su falta de estandarización. En la medida que se fueron simplificando y automatizando, estos métodos cada vez más se están incorporando al laboratorio microbiológico de rutina.

Uno de los objetivos de esta actualización es describir brevemente los métodos que más frecuentemente se emplean actualmente en el diagnóstico bacteriológico y virológico de las enfermedades infecciosas. Otro objetivo es señalar en qué casos resulta de interés la aplicación de estos métodos, especialmente en lo que hace al campo de la Pediatría y cuáles son las falencias que en tales circunstancias presentan las técnicas tradicionales.

MÉTODOS DE DIAGNOSTICO MOLECULAR

Los métodos de diagnóstico molecular, basados en la detección de ácidos nucleicos (secuencias de ADN o ARN específicos), han adquirido relevancia por su elevada sensibilidad y especificidad, rapidez y por no requerir la viabilidad del microorganismo para su realización.

La detección del material genético, se puede realizar mediante el empleo de distintas técnicas:

1. Sondas de ADN o métodos de hibridación directa

Su principio está basado en que las cadenas complementarias de ácidos nucleicos se unen para formar complejos (híbridos) bicatenarios estables. Para ello se emplean oligonucleótidos o sondas marcadas con radioisótopos, enzimas o quimioluminiscentes, dirigidos contra una secuencia específica de género o especie, que presente escasas diferencias entre cepa y cepa para evitar que se pasen por alto algunas de ellas. Sin embargo tienen una sensibilidad insuficiente para la detección de microorganismos directamente de muestras clínicas, ya que requieren de una carga microbiana mínima (10^4 unidades del genoma buscado). De ahí que para aumentar su sensibilidad, se deben elegir secuencias presentes en múltiples copias, como son los genes del ARN ribosomal. Son muy empleadas para confirmar la identidad de productos de ADN amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en sistemas de tipificación genotípica como la ribotipificación. Hoy en día se están usando en el comercio para la identificación de patógenos de crecimiento lento aislados en cultivo como *Mycobacterium tuberculosis* y hongos dimórficos sistémicos (*Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus neoformans*).

2. Chips o microarrays

Un chip o array de ADN es un conjunto de sondas moleculares fijadas de manera ordenada sobre un soporte sólido (ver Figura 1). Estas sondas pueden ser clones de ADN, productos de una PCR o bien nucleótidos sintéticos. Su principal ventaja sobre otras técnicas moleculares es su capacidad de detectar miles de genes en un único procedimiento. Básicamente, se purifica el ácido nucleico a identificar y se lo marca con un elemento radiactivo o fluorescente. Una vez marcado se lo enfrenta al array previamente sintetizado donde se une específicamente a las secuencias complementarias. Posteriormente se realiza un lavado para eliminar las moléculas que se hibriden en forma inespecífica y se registra la señal. Esta señal se somete finalmente a un proceso de digitalización, normalización y cuantificación. Tras este tratamiento se obtiene una colección de datos con las intensidades correspondientes a cada gen incluido en el array³.

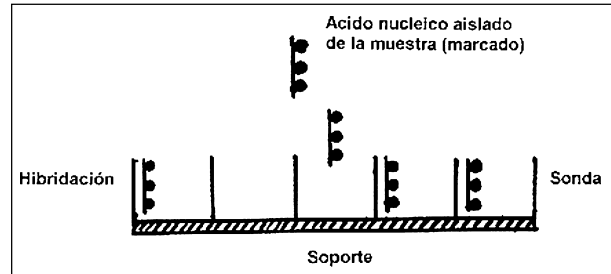


Figura 1: Esquema del proceso desarrollado en la detección de secuencias determinadas de ADN a través de *microarrays*.

Sus aplicaciones son variadas:

- Investigación de la patogenia bacteriana. Por ejemplo se ha investigado la respuesta de células del epitelio bronquial frente al efecto de una cepa no toxigénica y de otra toxigénica de *Bordetella pertussis*⁴.
- Estudio epidemiológico. Se puede analizar la diversidad bacteriana de una especie y su evolución estudiando los cambios genómicos ocurridos en aislamientos de distintas procedencias o distintas épocas.
- Estudio de los mecanismos de acción y resistencia a los antibióticos. Un ejemplo reciente del poder de esta tecnología está dado por un *microarray* capaz de detectar 90 genes de resistencia antibiótica en microorganismos gram positivos en un solo paso⁵.
- Diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas. Tiene el mismo principio que el descrito para sondas de ADN, se parte de cultivos bacterianos puros y difiere únicamente en la posibilidad de poder hibridar el ADN de una bacteria con muchos genes (p.ej. los que codifican para la subunidad 16S ribosomal de ARN perteneciente a las muchas especies que integran el género *Staphylococcus*)⁶.

3. Métodos de Amplificación

Podemos clasificarlos de forma sencilla en:

- Aquéllos que amplifican la señal usada para detectar el sitio "blanco" en los ácidos nucleicos, como por ej. *branched* ADN que se utiliza para la detección de *targets* de ácidos nucleicos con heterogeneidad de secuencia como HCV y HIV y que provee una detección cuantitativa⁷.
- Aquéllos que amplifican directamente ese sitio "blanco" como la PCR y métodos de amplificación por medio de transcripción, como NASBA y TMA entre los más empleados⁸.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es por lejos el método más ampliamente utilizado en el diagnóstico molecular y ha sido esencial para la rápida difusión de la Biología Molecular en el área médica.

La técnica fue descubierta en 1983 por el Bioquímico Kary B. Mullis, y le valió el Premio Nobel de Química en el año 1993. Desarrollada inicialmente en 1985, primero se aplicó al diagnóstico prenatal de anemias y al poco tiempo se aplicó al diagnóstico de la infección por HIV y otros microorganismos.

Permite la amplificación selectiva *in vitro* de una secuencia conocida de ADN o ARN de manera exponencial a partir de pequeñas cantidades, haciendo a este método extremadamente sensible.

En el área infectológica permite detectar y caracterizar agentes patógenos virales, bacterianos, micóticos y parasitarios. Se puede realizar a partir de trazas de cualquier material biológico e incluso puede aplicarse a material de archivo como es el tejido fijado e incluido en parafina. Esto no sólo facilita la obtención de muestras a partir de piezas quirúrgicas sino que también permite realizar estudios retrospectivos.

La potencialidad para detectar pequeñísimas cantidades de ADN (menos de 10 copias) la ha convertido en el procedimiento obvio para intentar el diagnóstico a partir de muestras minúsculas como las obtenidas por aspiración o biopsia con aguja fina o cuando se trata de detectar un agente patógeno en un medio muy diluido⁹.

Son técnicas muy versátiles y, por lo tanto, pueden adaptarse tanto al diagnóstico como a la detección de resistencias antibióticas y los mecanismos que las determinan. Tienen la propiedad de poder realizar análisis cualitativos (determinar la presencia o ausencia de un determinado patógeno en la muestra), importantes para el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas y/o análisis cuantitativos (conocer la carga microbiana de ciertos patógenos presentes en la muestra), de utilidad bien establecida. Por ejemplo permite monitorear el curso de la infección, establecer el pronóstico y evaluar el efecto de la terapéutica antiviral en el seguimiento de pacientes con enfermedades severas como HIV-SIDA o hepatitis por HCV. También resultan de utilidad en la detección de enfermedad activa, cuando se supera un determinado *cut-off* o valor de corte, en infecciones producidas por virus latentes como CMV y Epstein Baar.

Fundamento de la PCR

Es la amplificación enzimática y exponencial de un fragmento de ADN flanqueado por oligonucleótidos cebadores (*primers*) que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia nucleotídica de interés (secuencia blanco o *target*). Si el genoma a amplificar es ARN, es mandatorio realizar un paso previo a la amplificación propiamente dicha, que es la transcripción reversa (RT), para poder transformarlo en una copia de ADN complementario o cDNA utilizando enzimas denominadas ADN polimerasas dependientes de ARN o transcriptasas reversas.

Es un proceso repetitivo de ciclos, llevados a cabo en termocicladores automáticos que cambian la temperatura en segundos y donde cada uno de ellos comprende tres pasos (Figura 2):

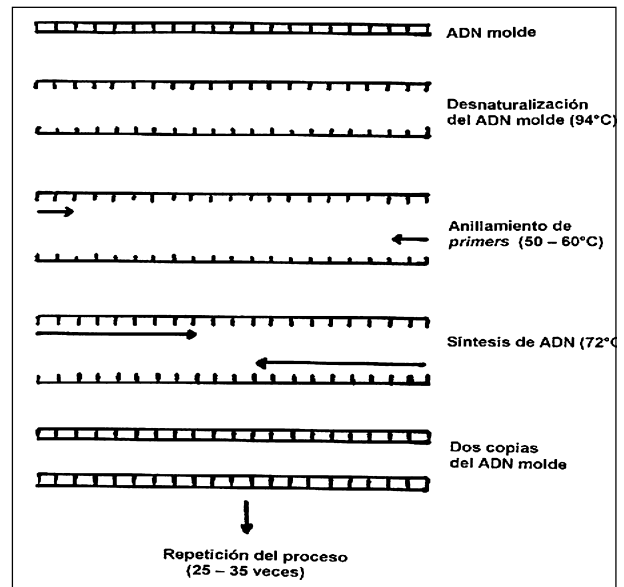


Figura 2: Pasos de la amplificación de ADN por la técnica de PCR.

a) Desnaturalización (90-95°C): donde el ADN de doble cadena se separa en monohebras que quedan libres en solución.

b) Fijación (*annealing*) de *primers* a cada monohebra de ADN (40-60°C): los *primers* son oligonucleótidos sintéticos de 20-30 pares de bases nucleotídicas que hibridan específicamente a las cadenas opuestas de la secuencia blanco. A partir de ellos la ADN polimerasa se engancha e inicia la síntesis de la hebra de ADN complementaria. Como los productos de extensión son también complementarios y capaces de unirse con los *primers*, cada ciclo sucesivo duplica la cantidad de ADN sintetizado en el ciclo previo

c) Extensión (70-75°C): síntesis de la doble cadena de ADN por medio de ADN polimerasas dependientes de ADN, termoestables, donde la más empleada es la Taq polimerasa, purificada a partir del *Thermus aquaticus*, en presencia de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato y adecuada concentración de magnesio.

Al cabo de un número determinado de ciclos (aproximadamente 40 ciclos) se obtiene un aumento exponencial del fragmento de interés, del orden de 2^n , donde n es el número de ciclos.

Variantes más usadas de la PCR

Nested PCR o PCR anidada. Es una doble PCR que utiliza 2 juegos de *primers*. En la primera ronda, la PCR se realiza con un juego de *primers* externos (*outer primers*) en relación a la secuencia del

material genético a amplificar y en la segunda ronda, con otro juego de *primers* internos (*inner primers*) respecto de la secuencia amplificada en primera instancia. Es la variante más usada ya que tiene mayor sensibilidad, por tratarse de dos PCR consecutivas. También tiene una mayor especificidad ya que la segunda PCR utiliza *primers* internos respecto de los extremos del primer producto, es decir que amplificará únicamente si hubo amplificación en la primera ronda.

Multiplex-PCR o PCR múltiple. Se colocan en forma conjunta dos o más pares de *primers* o cebadores, obteniéndose la amplificación simultánea de varios fragmentos de interés.

RT-PCR. Esta variante se utiliza cuando el material genético a amplificar es ARN. En este caso se debe llevar a cabo un paso previo de retrotranscripción por la enzima transcriptasa reversa (RT) para la síntesis de una copia de ADN (cDNA), la que luego servirá como molde para las reacciones de amplificación por PCR¹⁰.

Sistemas de detección de los productos de la PCR

La detección del producto amplificado puede llevarse a cabo mediante varias estrategias. Entre las más empleadas podemos mencionar a la electroforesis en gel de agarosa y visualización directa del producto amplificado mediante Bromuro de Etidio (colorante que se intercala entre las bases de la doble cadena del ADN) en un transiluminador UV como una banda fluorescente. También se emplean sistemas colorimétricos en microplacas (Roche Diagnostics) donde los trozos de ADN amplificados son capturados por una sonda específica unida a la microplaca y así estos productos de amplificación son detectados mediante una reacción de color

medida en un fotómetro, luego de adicionar una enzima conjugada y el sustrato apropiado¹¹.

Problemas de la técnica de PCR

Si bien cada técnica tiene diferentes exigencias y recomendaciones para su realización, según el germen involucrado, existen pautas generales que se deben cumplir para evitar resultados erróneos o la repetición de los procedimientos. Por ello toda muestra que se destine para una técnica de Biología Molecular debe ser remitida en recipientes estériles y nuevos, el tiempo de envío debe ser el menor posible y conservarse en frío (no se recomienda su congelamiento).

Como consecuencia de la extremada sensibilidad del método, una de las principales dificultades diagnósticas que se presentan con la PCR es la generación de resultados falsamente positivos (Tabla 2).

La estandarización inadecuada es una desventaja importante para lograr técnicas reproducibles, lo que principalmente ocurre con las técnicas caseras (*home made*).

Los métodos de PCR tradicionales han evolucionado desde la detección de los productos de amplificación al final de la fase de reacción (detección de punto final) hacia la detección de los amplicones mientras está ocurriendo la reacción o PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real o Real Time PCR

Esta metodología introducida recientemente, es un sistema cerrado que combina la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de los productos en un solo paso. Esto la hace más rápida, eficiente y disminuye el riesgo de contaminaciones cruzadas con amplicones ya que elimina la manipulación post-

TABLA 2: FACTORES DETERMINANTES DE RESULTADOS ERRONEOS CON EL METODO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

<p>Falsos positivos</p> <ul style="list-style-type: none"> Contaminación de una muestra a partir de una molécula de ADN proveniente de otra Arrastre de secuencias de ADN amplificadas en reacciones previas, presentes en los equipos de laboratorio y/o reactivos.
<p>Formas de minimizar los falsos positivos</p> <ul style="list-style-type: none"> Diseño de áreas específicas y físicamente separadas destinadas para la preparación de reactivos previamente a la amplificación (extracción de material genético) y posteriormente a la amplificación (amplificación propiamente dicha y detección del producto amplificado) Utilización de controles negativos múltiples Duplicados de muestras Atención meticulosa a la contaminación mediante el uso de guantes descartables, micropipetas que eviten la generación de aerosoles (con desplazamiento positivo), <i>tips</i> con barreras Radiación UV en todas las áreas a fin de disminuir la cantidad de ADN depositado en las superficies del laboratorio Métodos de inactivación enzimática de los productos amplificados como por ejemplo UNG (Uracil-N-glicosilasa)
<p>Falsos negativos</p> <ul style="list-style-type: none"> Fallas en la extracción del material genético Defectos en la preparación y/o conservación de la muestra por degradación del genoma Mala elección de <i>primers</i> Contaminación con RNasas Presencia de inhibidores de la Taq-polimerasa o interferentes como heparina, isopropanol, etanol 70°C, alto grado de hemólisis, agentes quelantes, detergentes, metales pesados como Fe y sustancias de naturaleza química desconocida.
<p>Formas de minimizar los falsos negativos</p> <ul style="list-style-type: none"> Coamplificar simultáneamente un templado utilizado como control interno o testigo de la reacción, o bien amplificar genes constitutivos presentes en las células humanas como el gen de la beta-actina o de la beta-globina.

PCR. El sistema de detección monitorea los cambios de fluorescencia producida a medida que va transcurriendo la amplificación, por lo que permite ver la acumulación de productos en tiempo real¹².

Es un ensayo cualitativo y cuantitativo, ya que mediante la cuantificación de la emisión de fluorescencia, podemos conocer la carga microbiana o el número de copias presente originalmente en la muestra. Con esta metodología también es posible realizar análisis de mutaciones y estudios de genotipificación¹³.

Existen varios instrumentos en el mercado, diseñados para llevar a cabo esta metodología (ABPrism™, ICycler™, Light Cycler[®], etc).

La metodología de Real Time-PCR permite la cuantificación del ADN ó ARN de manera más fácil y precisa que los métodos de PCR tradicionales ya que las mediciones se llevan a cabo en la fase temprana o exponencial de la reacción lo que le da alta reproducibilidad y precisión. En la PCR tradicional, la detección del amplicón se lleva a cabo en la fase final de la reacción o "plateau". Este es un momento en el que no hay más formación de productos por agotamiento del sistema y por lo tanto la eficiencia de la amplificación resulta altamente variable. Estas consideraciones, sumadas al hecho de que la electroforesis en gel de agarosa no es un método automatizado, discrimina únicamente por tamaño de banda, es de baja resolución y los resultados no están expresados como números, constituyen las principales limitaciones de la PCR tradicional frente a la PCR en tiempo real.

NASBA o amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos

Es un método de amplificación isotérmico, que se desarrolla a 41°C, a partir de RNA total presente en la muestra, previamente extraído y purificado. Se lleva a cabo por la actividad coordinada de tres enzimas (transcriptasa reversa, RNAsa H y T7 RNA polimerasa) y un par de *primers* específicos respecto de la secuencia *target* de interés. Consta de una Fase I (lineal) donde se produce la transcripción del RNA y una Fase II (cíclica) donde se produce la amplificación exponencial del RNA de simple cadena, complementario al *target* RNA original. La detección del producto se realiza por hibridación en fase líquida y puede llevarse a cabo por electroquimioluminiscencia o con *probes* fluorescentes (*molecular beacons*), estos últimos utilizados en la modalidad de *Real Time* o tiempo real.

APLICACIONES DE LOS METODOS MOLECULARES EN LA BACTERIOLOGIA Y VIROLOGIA CLINICAS

La técnica de PCR constituye una de las herramientas más valiosas dentro del campo de la Biología Molecular y más aún en nuestros días donde cada vez es mayor la inserción de esta metodolo-

gía tanto en la investigación básica como en las diversas especialidades clínicas^{9,14}.

La lista de aplicaciones para la detección de los distintos patógenos bacterianos y virales ha crecido enormemente. En esta actualización sólo mencionaremos las más empleadas, exceptuando las relacionadas a HIV y virus de la hepatitis, que, por su complejidad, requerirían de un tratamiento especial.

INFECCIONES GASTROINTESTINALES

Helicobacter pylori

H. pylori es un frecuente agente causal de dolor abdominal recurrente y patología gastroduodenal en Pediatría¹⁵. Su presencia se correlaciona con gastritis antral (incidencia del 10-31%) y se lo relaciona además con patologías tales como gastritis atrófica y cáncer gástrico.

Dado que en la niñez se supone que se produce la primoinfección, es importante poder valorar la repercusión que un tratamiento precoz seguido de la erradicación del germen podría tener sobre la aparición de patología gastroduodenal en etapas posteriores de la vida.

El diagnóstico de laboratorio involucra métodos invasivos como el cultivo, que es tedioso, requiere de medios suplementados y una incubación de 5 días que puede extenderse a 10 días en pacientes que han recibido antibióticos. El estudio histológico y la prueba rápida de la ureasa también se realizan sobre muestras de biopsia. Son comparables en sensibilidad y especificidad al cultivo pero se recomienda que se realicen en paralelo con éste. Estos métodos no aportan nada acerca del patrón de sensibilidad a los antibióticos y tampoco permiten la disponibilidad de la cepa para estudios epidemiológicos.

Los métodos no invasivos son habitualmente empleados para el seguimiento de la infección. La prueba de respiración de la urea marcada presenta una especificidad del 96% y una sensibilidad del 93%. La serología es de valor limitado para el conocimiento del estado de la infección una vez terminado el tratamiento ya que hay que esperar hasta seis meses para obtener un descenso del título de anticuerpos después de un tratamiento exitoso.

Si bien el método definitivo de diagnóstico es el aislamiento e identificación del microorganismo utilizando los métodos convencionales, la PCR es un método rápido, sensible y específico, que muestra buena correlación con el cultivo y la histología y es de gran utilidad para verificar la erradicación bacteriana post-tratamiento o predecir las recaídas. Su sensibilidad puede alcanzar hasta 1-10 unidades formadoras de colonias (UFC)¹⁶.

Recientemente se han descrito genes bacterianos específicos asociados con virulencia: *cag A* y *vac A*, cuya detección podría ser de importancia para conocer la evolución clínica de la enfermedad¹⁷.

Escherichia coli productora de toxina Shiga

En la última década las infecciones por *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), han emergido como una preocupación de la salud pública mundial, constituyéndose en un problema actual para nuestra población. *E. coli* O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de *E. coli* que comparten el mismo potencial patogénico. Los serotipos de STEC asociados a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Pueden causar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágicas y diarrea asociada al síndrome urémico hemolítico (SUH)¹⁸.

Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente 5-10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe tratamiento específico, sino de sostén. Los niños constituyen el grupo más vulnerable, con una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y riesgo de evolución a SUH. Este se define como una enfermedad de comienzo agudo caracterizada por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia y daño renal en un niño previamente sano.

En la Argentina el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica. Además es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes¹⁹.

En la actualidad, los métodos moleculares orientados a la detección genotípica de los factores de virulencia por la técnica de PCR sobre los aislamientos por cultivo, han contribuido a un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Se han desarrollado varios métodos, entre ellos una PCR múltiple que emplea *primers* específicos dirigidos a los genes que codifican para las citotoxinas, llamadas toxinas shiga (Stx) con sus variantes *Stx1* y *Stx2*, junto con el gen *rfb* correspondiente al lipopolisacárido O157. También es posible realizar PCR para determinar la presencia de genes asociados a virulencia como: factor *eae* (o intimina, responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y desorganización de las microvellosidades) y enterohemolisina, *hlyA* entre otros.

El diagnóstico precoz junto con la instauración temprana de la diálisis y el manejo de la anemia hemolítica, logró disminuir la letalidad durante el período agudo de un 30% a comienzos de la década del 60, a aproximadamente un 2,5% en la actualidad.

INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO

Bordetella spp.

La tos convulsa, tos ferina o coqueluche es una enfermedad respiratoria caracterizada por ser altamente contagiosa e inmunoprevenible y es causada por *Bordetella pertussis*. *Bordetella parapertussis* puede originar un cuadro similar, generalmente

mucho más leve y no prevenible por vacunación. *Bordetella bronchiseptica* es endémica en distintas especies animales, aunque en ocasiones también infecta a seres humanos, especialmente a huéspedes inmunocomprometidos.

El mayor número de casos de coqueluche se produce en niños menores de seis meses, no vacunados o parcialmente inmunizados y frecuentemente requiere del ingreso hospitalario debido a sus complicaciones.

En neonatos es una infección grave con presentación a menudo atípica (con apnea sin paroxismo acompañante) que dificulta el diagnóstico y puede llevar a la muerte.

En los adultos e individuos vacunados, generalmente se presenta como asintomática o con síntomas leves. Esto tiene implicación epidemiológica ya que se convierten en el principal reservorio y foco de exposición a lactantes y recién nacidos desprotegidos.

Existen otros agentes que causan un síndrome similar al producido por *B. pertussis* (Adenovirus, CMV, Virus Sincicial Respiratorio, *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydothyla* spp) que deben considerarse en el diagnóstico diferencial²⁰.

Por esto es importante un diagnóstico temprano y específico, no sólo para el tratamiento de la enfermedad, sino también para realizar la vigilancia epidemiológica y evaluación de la eficacia de la vacunación.

El diagnóstico de laboratorio involucra distintos métodos que deben combinarse adecuadamente para lograr los mejores resultados. (Tabla 3)

TABLA 3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DESTINADOS AL DIAGNÓSTICO DE *BORDETELLA PERTUSSIS*.

Método	Ventajas	Desventajas
Cultivo	100% de especificidad	Baja sensibilidad (6-60%) Lento (3 – 7 días) Requiere de medios especiales
Inmunofluorescencia directa	Rápido y sencillo	Arroja un porcentaje inadecuado tanto de resultados falsamente positivos como negativos
Métodos serológicos	Sencillo	Baja sensibilidad (21 – 67%)
PCR	Rápido, sensible (< 100 UFC/ml) y específico	

La PCR es más eficiente que el cultivo, especialmente sobre muestras recolectadas en el curso tardío de la enfermedad, en niños tratados con antibióticos y en pacientes con síntomas moderados²¹.

Hay métodos de PCR que permiten discriminar entre las tres especies más frecuentemente aisladas en patología humana²². También se han publicado

trabajos en los que, con la metodología Real-Time PCR, los autores pudieron detectar y diferenciar *B. pertussis* y *B. parapertussis* con una sensibilidad menor de 1 microorganismo por reacción²³.

Chlamydia trachomatis y *Chlamydomphila spp.*

Los principales agentes etiológicos responsables de infección respiratoria en humanos dentro de estos dos géneros son *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Chlamydomphila psittaci*. El primero es el agente etiológico más común de la conjuntivitis neonatal y una de las principales causas de neumonía en la edad temprana, como resultado de la exposición perinatal durante el parto. *Chlamydomphila pneumoniae* causa alrededor del 10% de las neumonías de la comunidad y es responsable de epidemias en poblaciones cerradas. *Chlamydomphila psittaci* es el agente causal de la psitacosis que es una zoonosis capaz de provocar brotes epidémicos.

Los métodos convencionales presentan limitaciones para el diagnóstico de estos agentes. Los cultivos celulares son laboriosos, caros y requieren la viabilidad del inóculo. Son de difícil implementación para *C. pneumoniae* y peligrosos para *C. psittaci*. La detección de antígenos (inmunofluorescencia o enzimoimmunoensayo) sólo ha sido evaluada en forma preliminar sobre muestras respiratorias sin resultados alentadores. La detección de anticuerpos en el paciente (inmunofluorescencia y fijación de complemento) da resultados retrospectivos, es laboriosa y de pobre especificidad. Resultan de utilidad únicamente en neonatos (detección de IgM específica), en el diagnóstico de linfogranuloma venéreo y en el de psitacosis.

Se han desarrollado métodos moleculares (PCR anidada o *nested PCR*) capaces de detectar y discriminar entre las tres especies más importantes²⁴.

Recientemente se ha desarrollado un método comercial utilizando la metodología NASBA en formato Real-Time, diseñado para la detección simultánea de *C. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila* como agentes productores de enfermedad respiratoria atípica.

Mycoplasma pneumoniae

Es el agente causal de la neumonía atípica primaria y la traqueobronquitis, que se presenta con mayor frecuencia en niños de edad escolar y adultos jóvenes.

Es responsable de más del 20% de las neumonías adquiridas en la comunidad y que con frecuencia requieren hospitalización. El 15% de estos pacientes desarrollan complicaciones extrapulmonares, incluyendo manifestaciones neurológicas, renales, cardiovasculares, etc.²⁵. Esta enfermedad respiratoria es a menudo subdiagnosticada ya que el cultivo es complejo, lento y de valor clínico limitado (t = 2 semanas). La serología (fijación de complemento) es

útil pero requiere de muestras pareadas en fase aguda y convalescente con el consiguiente retraso en la información. Por otra parte, se pueden originar resultados falsamente negativos (por ej. en adultos a veces la respuesta inmunológica resulta indetectable) y resultados falsamente positivos por reacciones cruzadas. La especificidad de la reacción es dependiente del antígeno empleado.

La determinación de IgM por inmunofluorescencia es de utilidad especialmente en niños, aunque igualmente puede haber resultados falsamente positivos. El uso de métodos moleculares para detectar ADN o ARN de *M. pneumoniae* adquiere relevancia ya que permite el diagnóstico dentro de las 24-48 hs con una capacidad para detectar alrededor de 40 copias genómicas en la variante *Nested-PCR*²⁶.

Un resultado positivo de PCR a partir de una muestra respiratoria puede indicar infección sin enfermedad y debería ser interpretado junto con los signos clínicos del paciente y los datos obtenidos de los estudios serológicos. Sin embargo, se sabe que la tasa de portación de *M. pneumoniae* en individuos sanos es inferior al 1% fuera de los períodos de brote, hecho que jerarquiza la utilización de la PCR al punto de ser considerada como *gold standard* en el diagnóstico de este agente²⁷.

Agentes virales

Se han desarrollado técnicas moleculares para el diagnóstico de virus en materiales respiratorios tales como Adenovirus, Virus Sincicial Respiratorio y Metapneumovirus entre otros^{28,29}.

En el diagnóstico de Adenovirus, el aporte de la PCR resulta de utilidad debido a la menor sensibilidad que presenta la inmunofluorescencia para la detección de este virus.

Los Metapneumovirus humanos son patógenos respiratorios recientemente descubiertos que causan un amplio espectro de síntomas clínicos que van desde un simple estado gripal hasta bronquiolitis fulminantes con falla respiratoria aguda. Su cultivo es lento y dificultoso, por lo que el método ideal para el diagnóstico es la PCR³⁰.

Mycobacterium tuberculosis

En el diagnóstico de la tuberculosis todavía quedan problemas sin resolver a pesar de los avances logrados en las técnicas biológicas, bioquímicas e inmunológicas. Especialmente estas técnicas resultan deficientes en aquellas situaciones en que se necesita un diagnóstico rápido, preciso y donde éstas tienen limitaciones: muestras respiratorias de niños y pacientes inmunosuprimidos, infecciones de localización extrapulmonar (pleura, sistema nervioso central, nódulos linfáticos y tejidos). Dentro de ellas, las infecciones del sistema nervioso central son las que presentan la mayor dificultad diagnóstica debido a que la microscopía revela baja positividad y el cultivo es insensible.

Se han desarrollado diversos métodos moleculares, tendientes a incrementar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para detectar estos organismos directamente en las muestras clínicas. Se ha reportado que estos métodos en muestras respiratorias, cuentan con una sensibilidad de aproximadamente 83% y una especificidad cercana al 97% mientras que en niños y muestras extrapulmonares, su sensibilidad oscila entre un 25% a un 60%³¹.

Es por ello que la FDA (Food and Drug Administration) recomienda el empleo de los métodos moleculares únicamente para el diagnóstico de pacientes no tratados, en muestras respiratorias con baciloscopia positiva y nunca como única herramienta diagnóstica sino en adición a los métodos tradicionales. No obstante hay autores que opinan que la real importancia de la aplicación de la PCR justamente radica en la posibilidad de detectar microorganismos en muestras paucibacilares. Es posible que perfeccionando los métodos se logre en breve cumplir con este objetivo³².

INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Agentes virales

Se ha reportado que el 58% de los casos de meningitis se presentan con líquido cefalorraquídeo (LCR) claro y dentro de esta categoría existen cuadros neurológicos de distinta etiología viral. Las principales razones para identificar el agente causal en estos casos de meningitis y encefalitis son:

- 1) Proveer una base racional para la quimioterapia y pronóstico de la enfermedad.
- 2) Limitar investigaciones innecesarias para descartar otras patologías neurológicas.
- 3) Proveer información epidemiológica.

Las técnicas convencionales de detección viral en LCR son frecuentemente insatisfactorias y requieren de personal y equipamiento especiales por lo cual en la gran mayoría de los casos hasta la actualidad estaba circunscripta a laboratorios de referencia. Los métodos moleculares, tales como PCR, RT-PCR y NASBA se han convertido en el *gold-standard* ya que permiten la detección directa del virus en LCR y nos brinda la posibilidad de un diagnóstico rápido, preciso y eficiente con un costo relativamente bajo³³.

Esto adquiere relevancia por ej. en el diagnóstico para el virus *Herpes simplex*, donde la calidad de vida del paciente depende de un tratamiento adecuado y temprano basado en un diagnóstico preciso y precoz. La encefalitis herpética es una de las causas más comunes de encefalitis fatal en EEUU y el tratamiento cuando se inicia precozmente puede disminuir la alta mortalidad asociada en más de un 70%. En la Argentina es la primera causa de encefalitis viral. (Freire MC, comunicación personal)

Previamente a la utilización de la PCR, el diagnóstico más rápido se podía efectuar por biopsia

encefálica o mediante la detección de anticuerpos en LCR y suero. En diferentes publicaciones se ha demostrado la mayor precocidad diagnóstica de la PCR y la ventaja de emplear LCR obtenido por maniobras menos cruentas y de menor riesgo.

Por otro lado, los Enterovirus (EV) son la causa más frecuente de meningitis aséptica y abarcan las especies Coxsackie A y B, Echovirus, Poliovirus y los nuevos Enterovirus. Se estima que representan el 80% de los casos de causa conocida.

Además de la meningitis aséptica existen otros casos de enfermedad asociada a infección por EV: fiebre inespecífica (a veces con *rash*, diarrea, síntomas respiratorios), patología eruptiva vesicular y en casos poco comunes, se observa miocarditis, parálisis y síndrome de sepsis severa en neonatos.

Generalmente, las infecciones por EV ocurren durante los meses de verano y principio del otoño. Si bien son en su mayoría autolimitadas y no se asocian con secuelas (excepto en pacientes inmunosuprimidos), en casos de brotes afectan a un alto número de personas con el consiguiente impacto social y/o económico.

De acuerdo con los casos reportados y analizados, la Argentina tiene una incidencia media de meningitis viral de 2.7 casos/100.000 habitantes, mientras que en EE.UU. la incidencia es de 8.0 casos/100.000 habitantes. Probablemente la incidencia real en nuestro país sea mayor debido al subdiagnóstico, ya que no se estudia en forma consistente.

Entre los métodos que existen para diagnosticar EV están el cultivo celular (*gold standard*), que provee resultados con gran demora, los métodos inmunológicos que tienen utilidad muy limitada y los métodos moleculares (RT-PCR o NASBA), que ofrecen ventajas significativas en el manejo clínico y menores costos^{34,35}.

Un diagnóstico temprano permite la reducción de los tiempos de internación, tratamiento antiviral endovenoso, intervenciones diagnósticas innecesarias y gastos hospitalarios. Además, permitiría a los pacientes tratarse con consultas ambulatorias, reservando la hospitalización para aquellos que presenten manifestaciones atípicas.

Los virus de toda la familia de EV pueden detectarse con una sensibilidad entre 10-100 copias de ARN por reacción.

DETECCION DE GENES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

Los métodos moleculares son utilizados especialmente en bacterias gram positivas donde la resistencia a antibióticos claves como meticilina o vancomicina es debida a un número limitado de alelos.

En las tres últimas décadas se ha incrementado la aparición de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina, particularmente en pacientes hospitalizados, causando infecciones nosocomiales

que requieren el uso de glucopéptidos. Actualmente se ha notado un incremento importante de resistencia a meticilina en *S. aureus* de la comunidad. Esta resistencia puede ser alcanzada por varios mecanismos y solamente aquella debida a la presencia del gen *mec A* requiere la recomendación de tratamiento con vancomicina y en algunos casos el aislamiento del paciente. El gen *mec A* codifica para la síntesis de una proteína ligadora de penicilina anómala (PBP 2a) con extremadamente baja afinidad por los beta-lactámicos.

La expresión fenotípica de la resistencia a meticilina no es una propiedad uniforme en todas las cepas y depende entre otras cosas del número de células de la población que exprese dicha resistencia, dando lugar al concepto de: resistencia homogénea (cuando se expresa en toda la población) y resistencia heterogénea (cuando se da en una subpoblación).

La detección de aislamientos que presenten una resistencia real a meticilina y su diferenciación de aquellos que son hiperproductores de beta-lactamasas puede ser dificultoso por los métodos convencionales.

El gen *mec A* es considerado un marcador molecular muy útil para la rápida detección de resistencia a meticilina mediante PCR, puesto que no está presente en aislamientos sensibles, presenta un alto nivel de homología entre *S. aureus* y *S. epidermidis* (mayor del 99%) y puede ser detectado independientemente de las condiciones de crecimiento³⁶.

Se sabe que la resistencia a vancomicina en enterococos es debida a la presencia de genes *van* que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de la pared celular. Se han desarrollado sistemas de amplificación que detectan los genes *van A*, *van B*, *van C1*, *van C2* en cepas de *Enterococcus* spp. y otros recientemente caracterizados³⁷.

Si bien las cepas Van C pueden ser clínicamente importantes, su resistencia intrínseca es de bajo nivel, no ha sido asociada con diseminación y por lo tanto no presenta los problemas epidemiológicos característicos de las cepas Van A y Van B.

La emergencia de estas últimas y su aparente capacidad de poder diseminarse a un amplio rango de huéspedes es preocupante. La rápida detección de esta resistencia permite adoptar medidas de prevención, incluyendo el aislamiento rápido del paciente para reducir la posibilidad de transmisión de estos microorganismos a otros pacientes hospitalizados. Hoy la PCR en formato *Real-Time* ofrece la posibilidad de obtener resultados en 4 horas y podría llegar a considerarse como un nuevo *gold standard* en la detección de este patógeno³⁸.

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislamientos

de una misma especie. Esta información es de gran utilidad, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos hospitalarios. En estos casos, dichos análisis permiten determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio, acceder a los posibles vehículos de transmisión, confirmar la asociación entre los pacientes infectados y evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones.

Tradicionalmente, los sistemas de tipificación han tenido en cuenta la expresión de características fenotípicas (características fisiológicas ó bioquímicas como biotipo, serotipo, antibiograma y sensibilidad a fagos). Si bien ellos constituyen el primer paso para la detección de una infección y la base para el comienzo de los estudios epidemiológicos, sus principales inconvenientes son su variabilidad, su bajo poder discriminatorio y su dependencia de una gran cantidad de reactivos específicos para cada especie bacteriana.

Con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares de tipificación, basadas en el estudio del ADN, se ha logrado un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas, ya que los sistemas de tipificación genotípica ofrecen las siguientes ventajas: (a) todos los aislamientos pueden tipificarse, (b) la estabilidad genética suele ser elevada, (c) se puede revisar el genoma completo y (d) presentan mayor reproducibilidad y mayor índice discriminatorio^{39,40}.

La premisa básica de cualquier sistema de tipificación genotípica es que aislamientos epidemiológicamente relacionados son derivados de una expansión clonal de un único precursor y consecuentemente presentan características que difieren de aquellos no relacionados epidemiológicamente.

De las aplicaciones clínicas de la tipificación basadas en el ADN, el estudio de brotes epidémicos hospitalarios es una de las más importantes.

La variación genética entre las diferentes cepas de un microorganismo puede detectarse mediante la digestión de ADN cromosómico o plasmídico con endonucleasas de restricción. Estas enzimas cortan secuencias específicas generando fragmentos de ADN cuyo tamaño y cantidad varían según la localización y frecuencia con que aparece ese sitio de restricción en el ADN. Luego estos fragmentos son separados por electroforesis en gel y visualizados con bromuro de etidio, generando las "huellas digitales" del ADN de la cepa. La probabilidad de detectar variantes, aumenta si se utiliza más de una enzima de restricción.

Si bien el perfil plasmídico, es una técnica rápida y económica, presenta el inconveniente de la inestabilidad del perfil debido a la transferencia de plásmidos y además un perfil idéntico no refleja necesariamente un parentesco genético. Este estudio refleja cambios en el contenido plasmídico más que una diversidad clonal.

Por el contrario, la digestión de ADN cromosó-

mico es estable y a menudo más discriminatoria que las "huellas digitales" de los plásmidos. Sin embargo, a veces es difícil de analizar debido a la cantidad de fragmentos generados. La interpretación se simplifica cuando son transferidos a una membrana de nylon o nitrocelulosa (impronta de Southern) y entonces son hibridados con una o más sondas derivadas de ADN mitocondrial, ADN ribosomal (ribotipificación) o un fragmento de ADN clonado al azar. Aquí se visualizan únicamente los fragmentos de ADN hibridados. Las sondas pueden marcarse con radioisótopos (se visualizan por autorradiografía), aunque ahora están siendo reemplazadas por marcas no radioactivas, que son más seguras, más económicas y de mayor vida media. Estos métodos tienen la desventaja de ser relativamente lentos y laboriosos ya que requieren el traspaso a membranas.

Entre los estudios genotípicos que no requieren técnicas de hibridación, la más utilizada es la técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE) o de macro-restricción. A través de ella se analiza el polimorfismo de los fragmentos de ADN genómico obtenidos con enzimas de restricción de bajo número de cortes o sitios de reconocimiento infrecuentes y resueltos mediante electroforesis en gel de campos pulsados. Se emplean equipos que cambian la dirección del campo eléctrico a intervalos predeterminados y de esta manera los fragmentos de ADN de alto peso molecular se ven sometidos a cambios de dirección en zig-zag que les permite reorientarse y entrar diferencialmente en el poro de la agarosa en función de su tamaño (Figura 3)⁴¹.

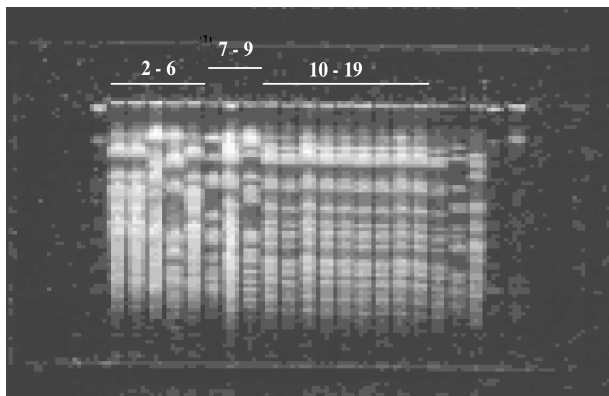


Figura 3: Análisis por PFGE (electroforesis en campos pulsados) de un presunto brote de infecciones por *Stenotrophomonas maltophilia* en el Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan". Nótese la falta de homología entre las cepas aisladas en Neonatología (líneas 7 y 9) y la relación entre las cepas de aislamientos clínicos entre sí (líneas 10 -19) y su diferencia con cepas ambientales (2-6).

Esta técnica es considerada el *gold standard* de los métodos de tipificación molecular por ser un método aplicable a virtualmente todas las especies bacterianas y analizar casi todo el genoma bacteriano (>90%) en un bajo n° de bandas (12-50 fragmen-

tos de ADN) generando un patrón de fácil visualización. Sin embargo, tiene los inconvenientes de ser muy laboriosa, lenta (alrededor de 4 días) y costosa en términos de equipamiento.

Los sistemas de tipificación basados en la metodología de PCR se fundamentan en la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares como la restricción enzimática, hibridación con sondas específicas o secuenciación de ácidos nucleicos. Por lo general, suelen ser más rápidos y sencillos de implementar, necesitan menor cantidad de ADN (del orden de los nanogramos) y permiten trabajar con un mayor número de muestras.

Son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, pero son menos discriminativas que el PFGE para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas clonalmente. Estas técnicas (RFLP locus específica y RAPD ó AP-PCR) pueden presentar problemas metodológicos relacionados con la inhibición de la amplificación y la contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Como desventaja está la falta de reproducibilidad entre laboratorios, ya que son muy sensibles a pequeñas variaciones metodológicas, por lo que es recomendable que se validen y optimicen en cada laboratorio.

También podemos mencionar la REP-PCR en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetitivas presentes en los genomas bacterianos (fundamentalmente enterobacterias). De esta manera se amplifican los fragmentos de ADN entre estas secuencias repetidas, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN⁴².

Esta técnica posee un poder de discriminación y reproducibilidad inferior al PFGE, aunque para algunas bacterias se ha visto que pueden ser similares.

El análisis de los patrones genómicos obtenidos por esta metodología ha provocado una nueva expectativa para la genotipificación bacteriana, dado que permite estudiar un amplio número de aislamientos, de manera rápida (menos de 24 hs), simple y con un costo relativamente bajo.

Finalmente tenemos la secuenciación de ADN, que se utiliza para ver defectos pequeños del genoma como por ejemplo mutaciones asociadas con resistencia a drogas.

En resumen, los métodos de tipificación molecular deben considerarse cuando se presenten aislamientos inusualmente frecuentes de un patógeno, *clusters* de un mismo microorganismo en un sitio particular o múltiples aislamientos con algún biotipo o antibiograma inusual.

En la actualidad se dispone de distintas técnicas

de tipificación basadas en la PCR que pueden utilizarse como método preliminar para el estudio de la relación clonal entre microorganismos de una misma especie. Los factores más importantes a tener en cuenta en la elección de un método sobre otro, son los de tipo técnico (técnica rápida, poco laboriosa, fácil de interpretar y con elevado poder de discriminación y reproducibilidad) y económico (bajo costo).

CONCLUSIONES

Hasta la actualidad, la microbiología molecular ha tenido un gran impacto en el campo diagnóstico y epidemiológico, aunque todavía existen problemas de estandarización y control de calidad por resolver. Estas técnicas deberán ser utilizadas con prudencia para evitar gastos innecesarios y un costo operativo mayor en circunstancias en que las técnicas clásicas pueden dar respuestas igualmente rápidas y efectivas.

En un futuro cercano, es probable que los mayores logros de la Biología Molecular en Microbiología sean obtenidos en el campo de la prevención y tratamiento mediante el desciframiento de la patogenia e inmunología de las infecciones (como por ej. identificar componentes principales de un microorganismo, esclarecer sus posibles funciones, etc.). Esto llevará al perfeccionamiento de mejores vacunas y al desarrollo de inmunoterapia en forma de citoquinas y anticuerpos recombinantes humanos, producto de la ingeniería genética, que podrían ser útiles como suplemento de los antibióticos, en particular para infecciones refractarias a los agentes quimioterápicos disponibles.

REFERENCIAS

1. Cox TM, Sinclair J: Biología Molecular en Medicina. Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1998.
2. Persing DH y col.: Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. ASM Press, Washington, D.C, EE.UU, 1993.
3. Domenech Sánchez A, Vila J: Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en microbiología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2004; 22: 46-54.
4. Belcher CE y col.: The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13.847- 13.852
5. Perreten V y col.: Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram- positive bacteria. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2291-2302.
6. Hamels S y col.: PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species and methicillin resistance. *Biotechniques* 2001; 31: 1364-1372.
7. Urdea MS y col.: Branched amplification multimers for the sensitive direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1991; 24: 197-200
8. Ginocchio CC y col.: Life beyond PCR: Alternative target amplification technologies for the diagnosis of infectious diseases (part I / II). *Clin. Microbiol. Newsl.* 2004; 26: 121-136.
9. Eisenstein BI: The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 178-183.
10. Podzorski RP, Persing DH: PCR: the next decade. *Clin Microbiol Newsl* 1993; 15: 137-144.
11. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-507.
12. Costa J: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2004; 22: 299-305.
13. Smith TF y col: Development, implementation, and trend analysis of Real-Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2004; 26: 145-153.
14. White TJ y col.: The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv Clin Chem* 1992; 29: 161-196.
15. Ruiz JA y col.: *Helicobacter pylori* y enfermedad gastroduodenal. *Metodología diagnóstica. Medicina Infantil* 1994; 1: 322-326
16. Kawamata O y col.: Nested-polymerase chain reaction for the detection of *H. pylori* with novel primers designed by sequence analysis of ureasa A gene in clinically isolated bacterial strains. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 266-272.
17. Van Doorn Y y col.: Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* genes by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1271-1276.
18. Paton JC y col.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-479.
19. Comité de Nefrología de la Sociedad Argentina de Pediatría. Incidencia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatr* 1995; 93:409-411.
20. Ieven M y col: Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 242-256.
21. Mastrantonio P y col.: Polymerase chain reaction for the detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates. *J Med Microbiol* 1996; 44: 261-266.
22. Reizenstein E y col.: Diagnostic evaluation of PCR discriminative for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 185-191.
23. Sloan LM y col.: Multiplex Light Cycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens: *J Clin Microbiol* 2002; 40: 96-100.
24. Messmer T y col.: Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2043-2046.
25. Waites KB, Talkington D: *Mycoplasma pneumoniae* and its role as human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 697-728.
26. Talkington DF y col.: Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in autopsy and open-lung biopsy tissues by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1151-1153.
27. Beersma MFC y col.: Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "gold standard". *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2277-2285.
28. Avellon A y col.: Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 2001; 92:113-120.
29. Mackay IM y col.: Molecular assay for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 100-105.
30. Domachowske JB: Human Metapneumovirus: a newly described respiratory pathogen of humans. *Clin Microbiol Newsl* 2003; 25: 17-20.
31. O'Sullivan CE y col.: Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1723-1727
32. Gomez-Pastrana D: Tuberculosis in children - is PCR the diagnostic solution?. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 541-544
33. Tenorio A y col.: Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 1993; 44: 261-269.
34. Zhang F y col.: Evaluation of a modified NucliSens Basic Kit application for the detection of enterovirus. *Abstr. S35. 17th Annual Clinical Virology Symposium. Pan American Society for Clinical Virology, Clearwater,FL., 2001.*
35. Zhang F y col.: Clinical performance and financial impact of rapid enterovirus detection in cerebrospinal fluid using the NucliSens Basic Kit and nucleic acid sequenced based amplification. *Abstr. T5. 18th Annual Clinical Virology Symposium. Pan American Society for Clinical Virology, Clearwater,FL., 2002.*
36. Vannffel P y col.: Specific detection of methicillin resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2864-2867.
37. Sahn DF y col.: Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2026-2030.
38. Dodgson KJ: VRE detection: a new gold standard? *Clin Microbiol Newsl* 2004; 26: 25-30.
39. Maslow JN y col.: Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17: 153-164.
40. Fernández-Cuenca F: Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2004; 22:355-360.
41. Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD: The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *En: Persing DH, Tenover FC, Smith TF, White TJ (ed) Diagnostic Molecular Microbiology, p. 563-572. ASM Press, Washington DC, 1993.*
42. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6823-6831.