

Biología molecular en Infectología. Parte II: Diagnóstico molecular de agentes infecciosos

ALEJANDRO CORVALÁN R.^{1,2}, FRANCISCO AGUAYO G.^{1,3},
JORGE LÉVICAN G.¹ e IGNACIO CORVALÁN V.¹

Molecular biology in infectious diseases - Part II: Molecular diagnosis of infectious agents

The diagnostic applications of the molecular biology in infectious diseases are wide and applicable to any diagnostic problem. In the Herpesviridae family, the most used methods are those based on the amplification of DNA polymerase gene for the detection of HSV 1 and 2, varicela-zoster, citomegalovirus, Epstein Barr virus and HHV6 simultaneously. This methodology has been able of detect the co-infection of HSV1 and VZV in samples of CNS fluid. In citomegalovirus, molecular methods are used in the monitoring of the reactivation of CMV in immunosuppressed patients and are able to detect viral reactivation within 1 week before symptoms. The molecular methods are also able to identify the Epstein-Barr virus in a proportion of 8 to 20% of gastric cancer cases harboring a unique strain in spite of the presence multiples strains in the healthy population. These associations between virus and cancer have also been described for the human papilloma virus and esophageal and lung cancer. In bacterial agents, the detection and quantification of *Bordetella pertussis* is another interesting application since it might become a method for rapid diagnosis and predictive of severity in children less than 6 months old. The identification of *Helicobacter pylori* strains in relation to gastric cancer and peptic ulcer disease and the characterization of strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* are other examples of potential applications of the molecular methods in typing microorganisms. In the diagnosis of respiratory tract infectious agents such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii* and atypical agents, the molecular methods allow the diagnosis in non-invasive samples. Finally, these new methodologies also contribute to the diagnosis of systemic mycotic agents (*Candidiasis* and *Aspergillosis*) particularly in immunosuppressed patients.

Key words: Infectious disease; Molecular biology; Molecular diagnosis.

Introducción

Las aplicaciones diagnósticas de la biología molecular son extremadamente variadas y básicamente son aplicables a cualquier problema diagnóstico asociado a procesos biológicos. Actualmente las principales aplicaciones están en enfermedades infecciosas, oncológicas y genéticas. En enfermedades infecciosas algunas de las principales aplicaciones diagnósticas se entregan en

la Tabla 1. Esta tabla muestra una visión panorámica de usos de la biología molecular, algunas de las cuales se encuentran implementadas en nuestro país y describiremos a continuación.

Virus herpes simplex

Los virus herpes simplex (VHS) tipo 1 y tipo 2 pertenecen a la familia *Herpesviridae*, y poseen ADN de doble hebra como material genético. Los

¹ Laboratorio de Biología Molecular Clínica Las Condes.

² Instituto Chileno Japonés de Enfermedades Digestivas Hospital Clínico San Borja Arriarán.

³ Laboratorio de Biología Molecular Hospital del Tórax.

Recibido: 31 enero 2003

Aceptado: 31 enero 2003

(Primera parte publicado en el N° 1 Vol 19, año 2002).

Tabla 1. Exámenes de biología molecular de uso clínico en Microbiología

Microorganismo	Metodología	Laboratorio
Virus		
Citomegalovirus	RPC branched DNA secuenciación	CA, CLC, PUC
Enterovirus	RT-PCR	CLC, CA, PUC
Virus de Epstein-Barr	RPC	CLC, HT
Virus de hepatitis C	branched DNA	HCUCH
Virus herpes simplex 1 y 2	RPC	CA, CLC, PUC
Virus de inmunodeficiencia humana	branched DNA secuenciación	ISP, HCUCH, CDM
Virus papiloma humano	RPC	ISP PUC
Bacterias		
<i>Bartonella henselae</i>	RPC	CLC, PUC
<i>Bordetella pertussis</i>	RPC	CLC
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		HT
<i>Legionella pneumophila</i>	RPC	CLC, HT
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		HT
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RPC	CA, CLC, PUC, HT
<i>Staphylococcus aureus</i> MR	PFGE RPC	PUC, ISP CLC
Hongos		
<i>Aspergillus</i> spp/ <i>Candida</i> spp	RPC	CLC
<i>Pneumocystis carinii</i>	RPC	CLC, HT

CA: Clínica Alemana, CLC: Clínica Las Condes, HCUCH: Hospital Clínico Universidad de Chile, PUC: Pontificia Universidad Católica, ISP: Instituto de Salud Pública, CDM: Centro Diagnóstico Molecular Bios Chile., HT: Hospital del Tórax.

métodos de identificación clínica de VHS 1 y 2 incluyen métodos directos como la tinción de Tzanck, detección por ELISA de antígenos virales, cultivos virales y métodos indirectos como la determinación de inmunoglobulinas. Todos estos métodos son de poca sensibilidad y especificidad y es en este contexto que los métodos moleculares constituyen una alternativa diagnóstica¹. Los métodos moleculares se basan en la amplificación por la reacción de polimerasa en cadena- RPC (o PCR- *Polymerase Chain Reaction* en inglés)² del gen de la enzima ADN polimerasa³ o del gen timidina kinasa⁴. La amplificación de la enzima ADN polimerasa permite la detección simultánea de varios virus de la familia *Herpesviridae* (VHS 1 y 2, varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y HHV6) y esto se debe al 80% de homología del gen de la ADN polimerasa de VHS 1 y 2 con la ADN polimerasa de otros miembros de la familia *Herpesviridae*. En esta estrategia las regiones de alta homología

son las utilizadas para la amplificación por RPC con partidores de consenso y las regiones de baja homología permiten la identificación de cada virus de la familia *Herpesviridae* a través de sondas específicas. Esta metodología se ha implementado como kit comercial (Pharmagen®) y ha sido utilizada en el Centro de Diagnóstico Molecular de BIOS Chile IGSA. Con ella se han realizado alrededor de 566 análisis con 102 (18,1%) muestras positivas. En esta casuística se ha detectado la presencia de VHS 1 y 2 en 59 muestras de LCR con 7 casos de coinfección por VHS 1 y VZV. La presencia de más de un agente viral de la familia herpes es un hallazgo de los métodos moleculares y ya ha sido descrita previamente⁵. La doble infección se demuestra por la positividad observada simultáneamente en análisis de serología y biología molecular para VHS 1 y VZV. La amplificación por RPC del gen timidina kinasa es otra estrategia de diagnóstico molecular de HSV tipo 1 y 2. Esta estrategia se basa en la similitud de hasta 60% del gen timidina kinasa entre VHS 1 y 2. Los partidores utilizados en este ensayo reconocen secuencias homólogas entre ambos virus

pero que flanquean una región con divergencias internas. Estas divergencias son reconocidas por enzimas de restricción que cortan en forma específica VHS 1 y 2 (Figura 1). Este método utiliza además una tercera enzima HaeIII, que reconoce ambos virus herpes y sirve como control de amplificación. La especificidad de esta metodología ha sido evaluada en muestras de cultivos virales y la sensibilidad se ha calculado en 50 copias virales. En la Tabla 2 se muestra nuestra experiencia clínica de la amplificación del gen timidina kinasa por RPC para el diagnóstico de VHS tipo 1 y 2. Se observa que en lesiones dermatológicas esta metodología es altamente sensible y específica; sin embargo, en muestras de LCR se observan falsos negativos. La incapacidad de demostrar la presencia de VHS tipo 1 se debería a la precocidad de la toma de la muestra (< 48 horas) ya que la literatura reporta que la eficiencia de los métodos moleculares está en



Figura 1. Esquema de la amplificación para herpes simplex tipo 1 y 2 por el gen timidina kinasa. El fragmento amplificado común para ambos virus es digerido con las enzimas de restricción NruI y SstII para diferenciar VHS-1 y VHS-2. HaeIII es una enzima que digiere los amplificados de ambos virus y sirve como método confirmatorio.

Tabla 2. Experiencia clínica con RPC para HSV 1 y 2

Tipo de muestra	N	Resultado	Comentario
Biopsia de pulmón	1	positivo	
Lavado broncoalveolar	1	negativo	
Lesión vesicular facial	1	positivo	
Líquido cefalorraquídeo	30	negativo	1 caso falso negativo (serología positiva)
Sangre periférica	3	negativo	
Secreción faríngea	1	negativo	
Secreción vaginal	1	negativo	
Tejido cerebral	1	negativo	
Frotis de lengua	1	negativo	
Total	40		

relación al momento de evolución de la encefalitis⁶. En una serie de 10 pacientes adultos con encefalitis viral aguda por VHS tipo 1, la amplificación por RPC demostró virus herpes inicialmente sólo en pacientes con evolución mayor a 48 horas (8 casos). En los 2 casos que no logró demostrar la presencia del virus, ambos tenían evolución menor a 48 hrs. Al obtener nuevas muestras de LCR, 4 días más tarde en uno y 7 días en el otro caso, ambos resultaron positivos⁶. Estos datos son concordantes con nuestros resultados de falso negativo en un caso con menos de 48 horas de evolución y sugerirían que los métodos moleculares, aunque son un aporte al diagnóstico de la encefalitis viral, no son capaces de la detección de VHS 1 en las etapas iniciales de la encefalitis viral.

Citomegalovirus

El CMV también pertenece a la familia *Herpesviridae* y posee especial tropismo hacia

fibroblastos, células epiteliales y leucocitos. En estas células, CMV efectúa su reproducción lítica o puede permanecer en estado episomal, habiendo grandes períodos de latencia con reactivaciones ocasionales bajo determinadas circunstancias, como la inmunosupresión inducida en pacientes transplantados⁷. Diversos métodos se han descrito para el diagnóstico de esta reactivación, como la serología, el cultivo de fibroblastos y la antigenemia⁸⁻¹⁰. Sin embargo, en los últimos años han aparecido numerosos reportes sobre la superioridad de los métodos moleculares en el monitoreo de la reactivación de CMV en pacientes inmunosuprimidos, en particular en ubicaciones tisulares^{11,12}. Uno de los métodos utilizados es la amplificación por RPC de la región promotora del gen pp65. Este gen codifica para una fosfoproteína de 65 Kda con ubicación en la matriz nuclear y que corresponde a una proteína de expresión tardía. Los partidores utilizados en este ensayo han sido diseñados utilizando la cepa Towne como referencia¹³ y análisis experimentales han demostrado una alta sensibilidad ya

que no amplifican otros genomas virales pertenecientes a familia *Herpesviridae* o de otros microorganismos. Estudios de sensibilidad indican que el método es capaz de detectar desde 4 células infectadas en 100.000 células analizadas y la validación clínica de esta estrategia se realizó correlacionando resultados moleculares con los de otros métodos de uso clínico, observando en 14 casos analizados 1 falso positivo y 1 falso negativo (sensibilidad 93%, especificidad 93%)¹⁴. En nuestro laboratorio hemos analizado 211 determinaciones de CMV, con 28 casos positivos, 179 negativos y 4 inhibiciones. Entre los casos positivos destaca la detección de CMV 7 y 3 días antes del inicio de la sintomatología en un paciente portador de un trasplante alogeneico de médula ósea por leucemia mieloide crónica y regresión de la positividad molecular al iniciar el tratamiento (Figura 2)¹⁴. Estos resultados indican que la amplificación por RPC sería capaz de detectar reactivación viral con una semana de anticipación a la aparición de los síntomas. Existen re-

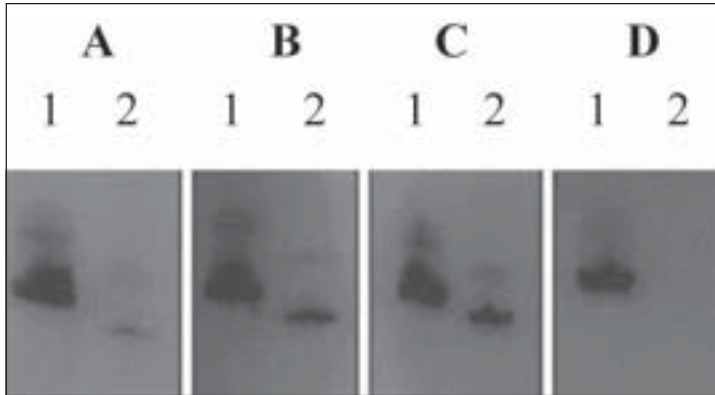


Figura 2. Amplificación positiva para CMV (caso clínico) A: RPC 7 días antes de los síntomas. B: 3 días antes de los síntomas. C: día de inicio de los síntomas e inicio terapia antiviral. D: 3 días de iniciado el tratamiento antiviral. 1: betaglobina humana (control positivo interno, 110 pb). 2: CMV-pp65 (102 pb). Se observa el aumento de intensidad de la banda de CMV entre A y C, y la desaparición de la banda de CMV en D.¹⁴.

portes en la literatura que indican que esta anticipación podría ser de por lo menos 10 días y que esta precocidad sería mayor en muestras de células mononucleares de sangre periférica que en muestra de suero^{15,16}.

Virus de Epstein-Barr

El VEB también pertenece a la familia *Herpesviridae* y aunque originalmente fue descrito asociado al linfoma de Burkitt, posteriormente se ha vinculado a patologías benignas como la mononucleosis infecciosa y otras neoplasias linfoides como enfermedad de Hodgkin y linfomas B en pacientes inmunosuprimidos¹⁷. El virus de Epstein-Barr también ha sido descrito en neoplasias epiteliales como carcinoma nasofaríngeo¹⁸ y linfopitelioma gástrico¹⁹ y recientemente también ha sido descrito en cáncer gástrico (CG) en una proporción de 8 a 20%²⁰. Las evidencias que apoyan la existencia de una asociación entre VEB y CG son la expresión de VEB exclusivamente en células tumorales²¹ (Figura 3), la demostración de genoma monoclonal de VEB en las células tumorales (lo que indica que la infección viral precede a la expansión neoplásica)²², la presencia de títulos de anticuerpos anti-VEB significativamente elevados en pacientes con CG asociado a VEB respecto a pacientes controles²²⁻²⁴, y la existencia de un patrón histológico único denominado “lace pattern”²⁵. El CG asociado a VEB se caracteriza además por un predominio en hombres, una ubicación principalmente en el tercio

medio y superior del estómago y una similar proporción en los dos tipos histológicos predominantes de CG (intestinal y difuso)^{21,26-30}. Dado que en Chile el CG es la primera causa de muerte por cáncer³¹, hemos analizado las características clínico-patológicas del CG asociado a VEB en una serie de 185 casos consecutivos³². Nuestros resultados indican una alta frecuencia de asociación entre VEB y CG ya que observamos 31 casos (16,8%) positivos, lo que representa la segunda frecuencia más alta del mundo, una distribución similar entre ambos sexos, una fuerte asociación con la ubicación en el tercio superior

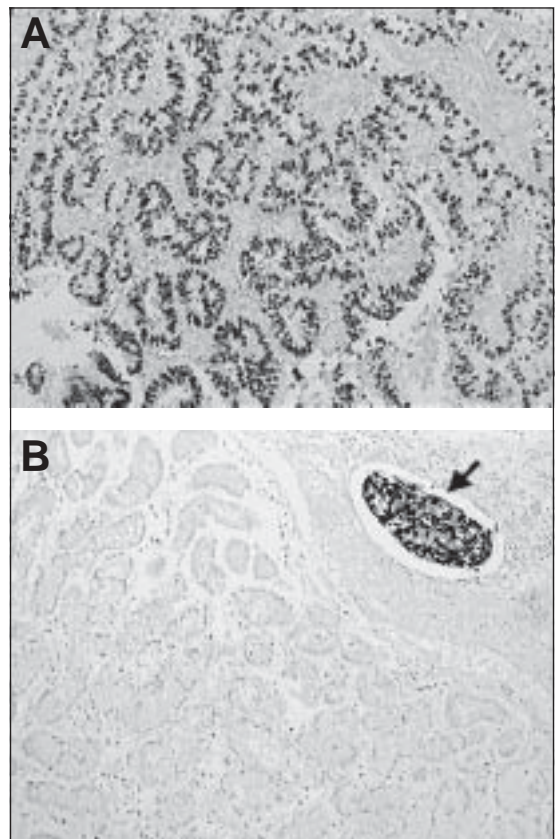


Figura 3. Hibridación *in situ* para virus de Epstein-Barr. A. Hibridación positiva en un caso de CG de tipo histológico “intestinal” en el cual se observan las estructuras glandulares y tinción positiva en todos los núcleos tumorales. B. Hibridación positiva en un émbolo tumoral (flecha), pero no en mucosa gástrica normal.

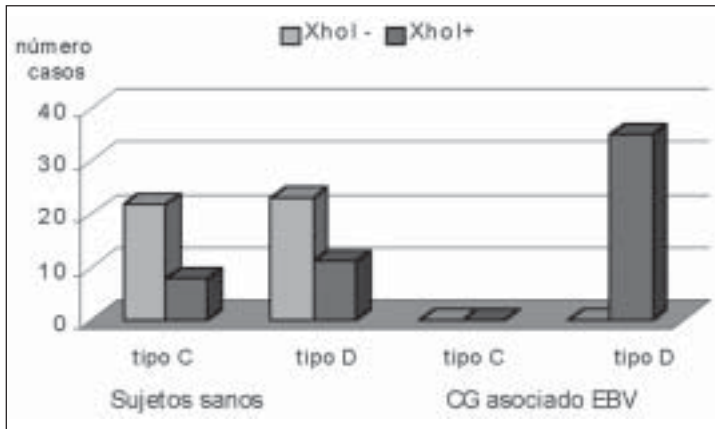


Figura 4. Genotipos del virus de Epstein-Barr en sujetos sanos y pacientes con cáncer gástrico. Se observa la presencia de 4 cepas en la población sana pero una sola cepa (tipo D XhoI positiva) en CG asociado a VEB.

del estómago y predominio del patrón histológico difuso³². Dado que estas características difieren de lo descrito previamente en países asiáticos y europeos^{21,26-28,30,33}, pero es similar al descrito en México³⁴ y en descendientes mexicanos en E.U.A.³⁵, hemos sugerido la presencia de un perfil único de CG asociado a VEB en Latinoamérica³². También hemos caracterizado el genotipo de VEB en casos de CG. Nuestros resultados se muestran en la Figura 4 donde se observa la presencia de 4 cepas en la población sana, pero sin embargo, una sola de ellas se encuentra en forma exclusiva en los sujetos con CG. Este resultado contradice la hipótesis aceptada que las cepas de VEB tienen asociaciones geográficas y no están relacionadas con neoplasias específicas³⁶. Nuestros resultados indican que sujetos sanos portadores de la cepa tipo D, XhoI positivo serían el único grupo en riesgo de desarrollar CG asociado a VEB entre la población sana (manuscrito enviado a publicación).

Virus papiloma humano

El virus papiloma humano (VPH) que pertenece a la familia *Papovaviridae*, tiene especial tropismo hacia tejidos epiteliales. En determinadas circunstancias el VPH puede no producir viriones maduros y permanece de manera episomal en estado de latencia o bien, puede integrarse de manera estable al material genético celular³⁷. Nuestra experiencia con VPH es fundamentalmente su detección en el cáncer de esófago y pulmón. Recientemente hemos detectado a través de RPC genotipo-específico un 46% de VPH-16 en carcinomas escamosos queratinizantes de pulmón³⁸.

Sin embargo, estos hallazgos deben ser confirmados mediante otras metodologías como “hibridación *in situ*”, dada la fuerte controversia respecto del probable rol carcinogénico de VPH en cáncer pulmonar.

Bordetella pertussis

La coqueluche o tos ferina es una infección aguda del aparato respiratorio causada principalmente por *B. pertussis* con una alta tasa de mortalidad en lactantes menores de tres meses de vida³⁹. Dado que la mayoría de los casos mortales son lactantes que no han alcanzado la inmunización completa^{40,41} se ha propuesto que todo

menor de tres meses, con diagnóstico de coqueluche debiera ser hospitalizado para monitoreo de su función respiratoria⁴². Los métodos de diagnóstico habitual son el cultivo microbiológico⁴³ y la inmunofluorescencia directa a partir de exudado nasofaríngeo⁴⁴. Sin embargo, ambos se caracterizan por una baja especificidad y sensibilidad y en este contexto, la detección molecular de *B. pertussis* en muestras directas de aspirado nasofaríngeo podría ser considerado como un método alternativo^{45,46}. Por otra parte, los resultados de la amplificación por RPC pueden ser cuantificados, lo cual podría tener implicancias en predecir de la severidad de la enfermedad y de este modo utilizarse como parámetro de hospitalización. Para validar estas hipótesis analizamos aspirado nasofaríngeo o sangre periférica de 132 pacientes ambulatorios y 64 hospitalizados amplificando el elemento repetido invertido RSBP-1 de *B. pertussis*⁴⁷. En 13 pacientes en los que se realizó RPC e IFD, 7 (53,8%) fueron positivos por RPC, pero sólo 1 fue confirmado por IFD. Sin embargo, la información clínica en todos los casos positivos fue concordante con el diagnóstico de coqueluche. Al cuantificar la intensidad de la amplificación de RSBP-1, observamos que en los pacientes ambulatorios, el promedio de la intensidad de la amplificación fue 71,2% (rango 1-150%) con respecto de la intensidad del control interno (beta-globina humana). Sin embargo, en pacientes hospitalizados ésta fue de 171% (10-500%). La mayor intensidad de amplificación en los pacientes hospitalizados es sugerente de una mayor carga bacteriana en los primeros y apoyaría la hipótesis de que la cuantificación de RSBP-1 podría ser un método de diagnóstico

rápido y predictivo de severidad de enfermedad en particular en niños menores de 6 meses⁴⁷.

Helicobacter pylori

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, microaerofílica que coloniza la mucosa gástrica. La presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica siempre esta asociada a inflamación o gastritis, pudiendo o no tener manifestaciones clínicas^{48,49}. Algunos de los mecanismos patogénicos de *H. pylori* son la presencia de flagelos, adhesinas, actividad de ureasa y, en un porcentaje de bacterias (alrededor de 70% de los aislados clínicos), la producción de una citotoxina con actividad vacuolizante (VacA) y una proteína asociada a la expresión de citotoxina denominada cagA (*cytotoxin associated gen A*)⁵⁰. *H. pylori* tiene entre 4 y 6 flagelos, cada uno compuesto por una flagelina mayor (FlaA) y una flagelina menor (FlaB). Ambas moléculas pesan 53kD pero sólo tienen 58% de homología entre ellas⁵¹; sin embargo, ambas moléculas tienen una alta homología con flagelinas de *Campylobacter coli* y *Salmonella typhimurium*. La pérdida de FlaA resulta en pérdida de motilidad con una disminuida capacidad de colonización gástrica. Sin embargo, la pérdida de FlaB no resulta en ninguna alteración. *H. pylori* produce una potente enzima ureasa. La generación de amonio por hidrólisis de la urea se cree que protege a *H. pylori* de la baja concentración de pH, una característica de la mucosa gástrica⁵². Por otra parte, la generación de amonio contribuye al daño de la mucosa gástrica a través de estímulo de la respuesta inflamatoria. Estudios de microscopía electrónica revelan que aunque la gran mayoría de *H. pylori* están flotando en el medio gástrico, un porcentaje de ellos están adheridos a la mucosa gástrica. Algunas de las adhesinas descritas se unían al grupo sanguíneo de Lewis y el uso de anticuerpos contra antígenos de Lewis han permitido bloquear la unión de *H. pylori* a la mucosa gástrica⁵³. *H. pylori* produce una toxina denominada vacA por su intensa actividad vacuolizante en células epiteliales en cultivo y produce ulceración y daño tisular al ser administrada oralmente en animales experimentales⁵⁴. Aunque todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen *vacA*, sólo 50% expresa la citotoxina vacA. La estructura genética de *vacA* corresponde a un mosaico con variaciones en la región media (denominado m1 y m2) y en la región aminoterminal (denominada s1a, s1b, s2). Varias publicaciones indican que la forma m1 es más activa que la m2 y que la forma s1a es más activa que la s1b. La forma s2 no tiene actividad.

En asociación con enfermedad ulcerosa péptica, las cepas s1 están en el 90% de los casos y en su gran mayoría son s1a⁵⁵. Por otro lado, la frecuencia de úlcera péptica en portadores de la cepa s2 no es mayor que en pacientes controlados⁵⁶. La presencia del gen A asociado a citotoxina (cagA) ha sido descrita en 38 a 70% de los aislamientos clínicos^{57,58}. Sin embargo, siempre la presencia del gen A se asocia a la producción de la proteína cagA y a una fuerte respuesta inmune, razón por la cual las pruebas serológicas son una buena estrategia para su detección. La presencia de la cepa cagA ha sido asociada al desarrollo de la úlcera gástrica y duodenal y también al desarrollo de gastritis crónica atrófica, la lesión precursora del cáncer gástrico⁵⁹. Recientemente se ha identificado la función de cagA. Esta proteína una vez secretada por *H. pylori* es transportada al interior de la célula epitelial, donde es fosforilada en residuos de tirosina e induce la expresión del factor nuclear-kb y liberación de IL-8, citoquina quimiotáctica para polimorfonuclear^{60,61}. Por otra parte, la fosforilación de cagA es un estímulo para la proliferación de la célula epitelial gástrica y también induce reordenamiento del citoesqueleto de la célula epitelial⁶².

Tipificación de microorganismos

Con el advenimiento de la biología molecular se han utilizado numerosas técnicas para la subtipificación de microorganismos, desplazando a un segundo plano las técnicas de tipificación mediante rasgos fenotípicos⁶³. El proceso de tipificación es importante epidemiológicamente para el reconocimiento de brotes de infección, en la detección de transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, en la detección de fuentes de infección y particularmente, en el reconocimiento de cepas virulentas de un microorganismo determinado⁶⁴. La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*) es considerada actualmente el "gold standard" de los métodos de tipificación molecular [65]. En este método el ADN genómico de la bacteria es digerido con enzima de restricción de corte infrecuente y posteriormente los fragmentos resultantes son separados en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico cuya polaridad es cambiada a intervalos variables. El campo pulsado permite una separación clara de fragmentos de ADN de gran tamaño molecular (10-800 kb), los patrones resultantes de la electroforesis se digitalizan para el análisis de las bandas, el cual se ejecuta con software comercialmente disponible (Applied Math, Bio-Rad, BioSystematics, Media

Cybernetics o Scanalytics). La técnica de PFGE ha probado ser altamente discriminatoria en la tipificación de muchas especies bacterianas; sin embargo, su uso se ha limitado sólo a ciertos centros de referencia por el alto costo que implica su implementación. Como alternativa a esta metodología se han planteado numerosas técnicas de tipificación basadas en amplificación por RPC^{65,66}. Esta técnica permite que determinados *loci* genéticos sean amplificados y examinados en busca de variaciones características de cada cepa. Inicialmente los *loci* son amplificados con partidores específicos, sometidos a análisis de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) y visualizados por electroforesis. Esta metodología se ha utilizado en el análisis de diversos *loci*, los que como condición deben presentar heterogeneidad dentro de la misma especie. Dentro de los *loci* utilizados se encuentran el operon rRNA en *Staphylococcus aureus* (ribotipificación), el gen *ureC* en *H. pylori* y el gen *katG* de *Mycobacterium tuberculosis*⁶⁵. Sin embargo, la principal falencia de estos ensayos radica en la limitada región del genoma que puede ser examinada, hecho que resulta en un menor poder de discriminación en comparación con PFGE. Dentro de las técnicas basadas en la amplificación *locus* específico, nosotros hemos utilizado la región espaciadora 16S-23S del *locus* rRNA (RS-PCR, Ribosomal Spacer PCR) para la tipificación de cepas nosocomiales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR). Esta región espaciadora presenta múltiples polimorfismos en secuencia y longitud los que, luego de ser amplificados con partidores específicos, generan patrones de bandas propios de cada clon de SAMR^{67,68}. Nosotros hemos estudiado 40 cepas de SAMR aislados a partir de 3 hospitales de la ciudad de Santiago, analizándolos por RS-PCR y PFGE. El método RS-PCR mostró 5 perfiles alélicos diferentes los que en su totalidad fueron confirmados por PFGE. Esta última técnica distinguió además un subtipo (cepas estrechamente relacionadas) que no fue posible visualizar con RS-PCR. Además RS-PCR demostró ser altamente reproducible luego de la tipificación reiterada de 10 aislamientos diferentes en experimentos consecutivos, resultando los mismos perfiles alélicos. Por ambos métodos se llegó a determinar la existencia de un clon ampliamente diseminado, presente en la mayoría de los aislamientos de SAMR en las tres instituciones analizadas, lo cual indicaría la presencia de un "clon epidémico"⁶⁹, hecho que se ha descrito en otras regiones del mundo⁷⁰. Otro grupo de métodos basados en amplificación por RPC son los denominados

RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) y Rep-PCR (*repetitive-PCR*). El primero esta basado en que pequeños partidores (10 pb) cuya secuencia es inespecífica y no es dirigida a un *locus* genético determinado sino que, a bajas temperaturas de alineamiento, hibridiza en forma arbitraria en ciertos sitios cromosómicos con suficiente afinidad para permitir la iniciación de la polimerización^{65,66}. De este modo, la presencia de estos sitios en dos puntos en hebras de ADN complementarias en dirección opuestas una a la otra permite la amplificación del fragmento entre estos dos puntos. El número de localizaciones de estos puntos varía según la cepa. Este ensayo es atractivo porque sirve para la tipificación de cualquier microorganismo (por ej. bacterias o levaduras) y presenta un alto poder de discriminación. Sin embargo, este método posee baja reproducibilidad y es de difícil interpretación. Rep-PCR se basa en la presencia de secuencias repetitivas presentes en casi todas las especies de bacterias que pueden ser utilizadas como secuencias de consenso para la hibridización de partidores que inician la amplificación en estos sitios⁷¹. Estas secuencias se ubican típicamente en varios sitios del genoma bacteriano, así cuando dos secuencias repetidas son localizadas una cerca de la otra, la región flanqueada puede ser efectivamente amplificada. Para este efecto se han utilizado principalmente secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas, identificadas en muchos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. La misma estrategia se ha usado con otras secuencias repetitivas, como secuencias de los operones ribosomales, secuencias de inserción y secuencias *Shine Dalgarno* (sitio de fijación de ribosoma). Este método ha mostrado buena reproducibilidad, bajo costo, baja complejidad y un poder de discriminación que depende de la secuencia repetitiva analizada⁷¹. El último paso en el desarrollo de estrategias para tipificación ha sido el surgimiento de técnicas basadas en secuenciación de ADN lo que se ha visto favorecido por la aparición de técnicas de secuenciación automática^{65,66}. La secuenciación completa de algunos microorganismos y su posterior análisis han sentado las bases para el desarrollo de nuevos ensayos que permiten discriminar entre diferentes clones. Junto con ello, la creación de una red abierta para la comparación objetiva de secuencias de determinados genes bacterianos denominado *multilocus sequence typing* (MLST) constituye otro avance en la tipificación de microorganismos⁷². En MLST, 6 a 8 genes constitutivos de una bacteria determinada son secuenciados, y con las secuencias se genera un perfil alélico que

será comparado vía internet con otros perfiles alélicos de cepas aisladas en diferentes partes del mundo. Esta iniciativa es valiosa ya que es un primer paso para la constitución de una base de datos de una red epidemiológica global⁷².

Mycobacterium tuberculosis

La tuberculosis es causada por microorganismos del género *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) que incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. El bacilo tuberculoso es delgado, de 1 a 4 µm de longitud y posee una pared más compleja que todas las bacterias conocidas⁷³. El diagnóstico de tuberculosis es a menudo difícil y aún está basado en las técnicas de microscopía y cultivo en medio Lowenstein-Jensen⁷³ que requieren a lo menos 30 días de incubación. Como una alternativa de diagnóstico rápido han surgido los métodos de amplificación de ácidos nucleicos de los cuales existen diversos *kits* comerciales^{74,75}. Sin embargo, por el alto costo de estos reactivos y por la necesidad de establecer formatos que permitan amplificar distintas secuencias de *M. tuberculosis* bajo un mismo programa de amplificación, diseñamos un sistema basado en la amplificación de un fragmento de IS6110 de *M. tuberculosis* y hemos utilizado partidores reportados en la literatura para amplificar una región interesparadora de ADN codificante para genes ribosomales⁷⁶⁻⁷⁹. IS6110 se encuentra en alto número de copias (50-60) en el interior del genoma de *M. tuberculosis*⁸⁰ y es altamente específica. Los partidores diseñados para *M. tuberculosis* generan un fragmento de 120 pb y la especificidad del amplicón es confirmada con la enzima de restricción Alu I. El análisis de sensibilidad, que se realizó diluyendo una muestra con recuento conocido usando como matriz líquido pleural, indicó que podemos detectar un mínimo de 2 bacilos en una muestra clínica (equivalente a 120 moléculas de IS6110). Sin embargo, la sensibilidad del método, en correlación con el cultivo de Lowenstein-Jensen es limitada (45%) aunque la especificidad es muy alta (100%)^{78,81}. Estos datos concuerdan con los obtenidos usando partidores reportados para genes ribosomales⁷⁹. La baja sensibilidad se puede deber a los procedimientos asociados a la extracción del ácido nucleico de MTB puesto que la estructura de la pared celular es dos veces más fuerte que la de los bacilos Gram negativos⁷³. Esta etapa es crítica en la eficiente liberación del material genético para poder posteriormente ser amplificado. Ac-

tualmente estamos desarrollando métodos de RPC anidado para lograr una mayor sensibilidad, RPC doble y RPC de transcripción reversa, para detectar ARN mensajero de MTB, lo cual puede correlacionar con infección activa, o como monitoreo de la terapia antituberculosa y aumentar a la vez la sensibilidad en la detección del bacilo tuberculoso⁸².

Pneumocystis carinii

Pneumocystis carinii spp *hominis* es un patógeno que provoca cuadros de neumopatía severa en pacientes inmunosuprimidos. Se admite que la mayoría de las personas se infectan por *P. carinii* posiblemente antes de los cuatro años de vida, pudiendo existir transmisión madre-hijo⁸³ pero la infección es asintomática y el microorganismo permanece latente (desarrollo de formas quísticas) reactivándose sólo cuando existe una disminución de la inmunidad⁸⁴. El diagnóstico de *P. carinii* se construye por la visualización microscópica o inmunofluorescencia (IF) de muestras de esputo, lavado broncoalveolar o biopsia transbronquial. Sin embargo, estos métodos presentan sensibilidad y especificidad limitadas, en particular en muestras no obtenidas en forma no invasora como secreción bronquial (SB)⁸⁵. Se ha reportado que diversos formatos de amplificación por RPC presentan un rendimiento diagnóstico promisorio⁸⁶⁻⁸⁸ aunque su detección en pacientes inmunocomprometidos sin enfermedad por *P. carinii* sugiere la presencia de colonización o infección subclínica, lo cual podría disminuir el valor diagnóstico de esta metodología. En nuestro laboratorio diseñamos y validamos un método "in house" para la detección de *P. carinii* en lavado broncoalveolar (LBA) y SB de pacientes con sospecha clínica de neumonía intersticial por *P. carinii*⁸⁹. Nuestro método amplifica, con una sensibilidad de 100 copias genómicas, un fragmento de 191 pb de la subunidad mayor del ARN 23S ribosomal, la cual es digerida por la enzima XhoI como método confirmatorio. Al comparar la amplificación por RPC con la tinción de azul de toluidina (TAT) en LBA observamos porcentajes similares de positividad [59,3% (32/54) para RPC y 51,9% (28/54) para TAT]. Sin embargo, en muestras de obtención no invasora (SB) la TAT tuvo un porcentaje de casos positivos de 22,5% (9/40) con respecto a la amplificación por RPC [35% (14/40)]. Tomados en conjunto y usando el diagnóstico clínico final de neumonía intersticial por *P. carinii* como *gold standard*, la sensibilidad y especificidad de la RPC fue de 93,8 y

100% respectivamente *versus* 66,7 y 87,5% de la TAT. Estos resultados indican que la muestra de SB sería adecuada para el diagnóstico de neumonía intersticial por *P. carinii* utilizando amplificación por RPC⁹⁰. El uso de método más sensibles como RPC doble o RPC anidado para mejorar la sensibilidad, han presentado una alta proporción de falsos positivos lo que implica una pérdida de correlación clínica⁹¹.

Microorganismos “atípicos”

En Chile, en el año 1998 las neumonías fueron la primera causa de muerte en la población, sin distinción de sexo ni edad, con una tasa de 39,9 por 100.000 habitantes. Las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) que tienen un curso clínico y características radiológicas diferentes a las neumonías de origen neumocócico, se denominan “neumonías atípicas”⁹². Comúnmente se atribuye a ciertos microorganismos, también llamados “atípicos”, la causa de esta patología. Ellos incluyen a *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophyla*⁹². Sin embargo, en la rutina asistencial sólo es posible llegar a la identificación del agente causal de las neumonías en una minoría de casos, debido a las limitaciones de los métodos de diagnóstico etiológico. El difícil diagnóstico de los agentes atípicos se fundamenta en la falta de un método *gold standard* o referencia disponible para su uso clínico. Los métodos actuales son el análisis serológico a través de IFI, puesto que el cultivo de estas bacterias es complicado. Por esta razón y por su alta sensibilidad y especificidad, los métodos de diagnóstico molecular como la RPC, han surgido como una alternativa diagnóstica a ser evaluada^{93,94}. Además, dado que los métodos moleculares permiten el análisis de muestras respiratorias, es posible usar expectoración o esputo inducido, evitando la ejecución de métodos invasores. *Mycoplasma pneumoniae* es la causa más frecuente de neumatías atípicas en niños y adultos y es un agente pleomórfico sin pared celular, perteneciente al género *Mycoplasma*. *M. pneumoniae* se une al epitelio respiratorio introduciéndose entre los cilios de éste y ocasiona daño directo, aparentemente por la producción de radicales libres. Este daño celular induce ciliostasis, lo que explica la tos persistente que produce la infección por este microorganismo. *Chlamydia pneumoniae* es una bacteria funcionalmente deficitaria, ya que no puede sintetizar ATP, obteniéndolo de la célula huésped; *C. pneumoniae* representa ~8% de pacientes con NAC⁹⁵. *Legionella pneumophyla* tiene baja incidencia en

NAC pero constituye una infección grave que requiere mayor dosis del agente antibacteriano⁹⁶. Nuestra experiencia en la detección molecular, a través de RPC de microorganismos atípicos, ha demostrado no ser concordante con la información que ha sido obtenida mediante métodos serológicos⁹⁵. Si bien es cierto, usando este último tipo de métodos, la seroprevalencia de cada microorganismo es de aproximadamente 8 a 10% para pacientes con NAC, nuestros hallazgos a través de RPC son mucho más bajos (2 a 5%), cuando se emplean muestras respiratorias como expectoración o LBA. Sin embargo, la dificultad de disponer de métodos *gold standard* dificulta la evaluación de los ensayos moleculares como la RPC. En todo caso, siendo la especificidad bastante alta, se hace necesario disponer de alternativas moleculares más sensibles para la eficiente detección de estos agentes infecciosos, marcando un desafío a ser resuelto en un futuro cercano.

Infecciones micóticas: Candidiasis y aspergilosis

La frecuencia de infecciones por hongos, *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, se ha incrementado en los últimos años debido al aumento de pacientes inmunosuprimidos por el uso de quimioterapia en altas dosis, y por el uso masivo de antimicrobianos de amplio espectro. Los métodos estándares para la detección de infecciones micóticas más frecuentes como el cultivo micótico y la histopatología, tienen una reconocida baja sensibilidad y especificidad, por lo que se han desarrollado métodos moleculares para mejorar el diagnóstico⁹⁷. En nuestro laboratorio desarrollamos partidores específicos para *Candida* spp y *Aspergillus* sp basándonos en la amplificación por RPC de la subunidad 5,8 S del ARN ribosomal. La validación de esta estrategia se muestra en la Figura 5 donde se observa amplificación de un fragmento de 124 pb de la subunidad 5,8 S para varias especies de *Candida* y *Aspergillus* pero no para *P. carinii*, un agente importante en el diagnóstico diferencial de las micosis sistémicas. La experiencia clínica con este método se muestra en la Tabla 3 donde se observan los resultados de 89 casos de mucosa o secreción nasal realizados. Los casos positivos representan 5,7% del total de los casos analizados, lo cual es significativamente menor a lo reportado en la literatura que llega hasta 42%⁹⁸. En esta serie preliminar sería interesante la correlación con otros métodos como cultivo e histología.

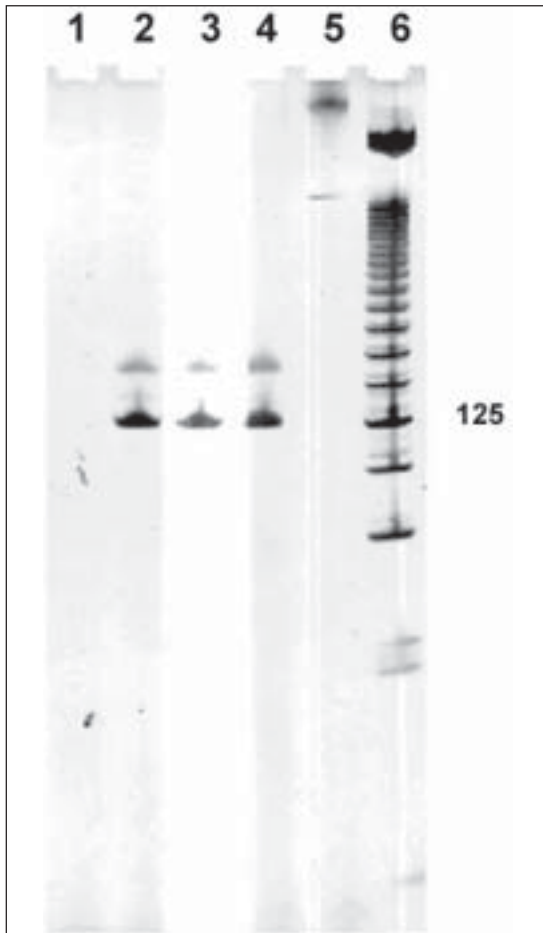


Figura 5. Amplificación por RPC de gen 5,8S, *Candida* sp. y *Aspergillus* sp. Carril 1, control negativo, carril 2 *Candida albicans* (cultivo), carril 3 *Candida tropicalis* (cultivo), carril 4 *Aspergillus fumigatus* (cultivo), carril 5 *Pneumocystis carinii* (caso clínico), carril 6 Marcador peso molecular. Se observa amplificación en carriles 2 a 4 correspondientes a muestra de *Candida* sp y *Aspergillus* sp. El carril 5 correspondiente a *P. carinii* no muestra de evidencias de amplificación por RPC.

Resumen

Las aplicaciones diagnósticas de la biología molecular para enfermedades infecciosas son extremadamente variadas y aplicables a cualquier problema diagnóstico. En agentes virales de la familia *Herpesviridae*, los más usados se basan en la amplificación del gen de la enzima ADN polimerasa que permite la detección de virus herpes simplex (VHS) 1 y 2, virus varicela-zoster (VVZ), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB) y herpesvirus humano (HVH) 6 en forma simultánea. Esta metodología ha detectado la coinfección por VHS 1 y VZV en muestras de líquido cefalorraquídeo. En CMV son utilizados en el monitoreo de la reactivación de CMV en pacientes inmunosuprimidos siendo capaz de detectar reactivación viral con una semana de anticipación a la aparición de los síntomas. Los métodos moleculares han permitido la identificación del VEB en una proporción de 8 a 20% de casos de cáncer gástrico los cuales poseen una cepa única a pesar de la presencia de múltiples cepas en la población sana. Estas asociaciones entre virus y cáncer también se han descrito para el virus papiloma humano y cáncer pulmonar. En agentes bacterianos, la detección y cuantificación de *Bordetella pertussis* es otra aplicación relevante ya que podría convertirse en un método de diagnóstico rápido y predictivo de severidad de enfermedad en niños menores de 6 meses. La caracterización de cepas de *Helicobacter pylori* en relación con cáncer gástrico y enfermedad ulcerosa péptica, y la caracterización de cepas nosocomiales de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SAMR), son ejemplos de las potencialidades de los métodos moleculares en la tipificación de microorganismos. En el diagnóstico de agentes causantes de patologías respiratorias como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii* y agentes "atípicos" de infecciones respi-

ratorias, estos métodos han permitido el diagnóstico a partir de muestras de obtención no invasora. Finalmente, también han demostrado su aporte en el diagnóstico de infecciones micóticas (candidiasis y aspergilosis), en particular en pacientes inmunocomprometidos.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de Edwig Rodríguez Q.F. en la elaboración de la sección *Mycobacterium tuberculosis*. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por

Tabla 3. Amplificación por RPC de *Candida* spp y *Aspergillus* spp en muestras de mucosa nasal

Tipo muestra	resultado	N	%
Pólipo nasal	negativo	23	92,0
	positivo	1	4,0
	inhibido	1	4,0
		25	5 (5,6%)
Secreción sinusitis	negativo	59	92,2
	positivo		4
	inhibido		1
		64	
Total		89	

el proyecto Métodos de Vigilancia Epidemiológica, Subdirección Académica Clínica Las Condes.

Bibliografía

- 1.- Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3274-9.
- 2.- Corvalán A. *Biología Molecular en Infectología. Parte I Desarrollo y aplicaciones.* Rev Chil Infect 2002; 19: 14-24.
- 3.- Tenorio A, Echevarría J E, Casas I, Echevarría J M, Tabares E. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993; 44: 261-9.
- 4.- Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1991; 337: 189-92.
- 5.- Tang Y W, Espy M J, Persing D H, Smith T F. Molecular evidence and clinical significance of herpesvirus coinfection in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2869-72.
- 6.- Studahl M, Bergstrom T, Hagberg L. Acute viral encephalitis in adults-a prospective study. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 215-20.
- 7.- Britt W J. A.C.A.C., in: *Fields Virology*, Third edition, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996; 2493-513.
- 8.- Tanabe K, Tokumoto T, Ishikawa N et al. Comparative study of cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay, polymerase chain reaction, serology, and shell vial assay in the early diagnosis and monitoring of CMV infection after renal transplantation. *Transplantation* 1997; 64: 1721-5.
- 9.- Bein G, Bitsch A, Hoyer J et al. A longitudinal prospective study of cytomegalovirus pp65 antigenemia in renal transplant recipients. *Transpl Int* 1993; 6: 185-90.
- 10.- Landry M L, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2851-6.
- 11.- Stephan F, Fajac A, Grenet D et al. Predictive value of cytomegalovirus DNA detection by polymerase chain reaction in blood and bronchoalveolar lavage in lung transplant patients. *Transplantation* 1997; 63: 1430-5.
- 12.- Kusne S, Manez R, Frye B L et al. Use of DNA amplification for diagnosis of cytomegalovirus enteritis after intestinal transplantation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1121-8.
- 13.- Depto A S, Stenberg R M. Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products. *J Virol* 1989; 63: 1232-8.
- 14.- Aguayo F, Corvalán A. Diagnóstico molecular de citomegalovirus. *Rev Med Clínica Las Condes*, 1999; 10: 28-31.
- 15.- Boeckh M, Gallez-Hawkins G M, Myerson D, Zaia J A, Bowden R A. Plasma polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with polymerase chain reaction using peripheral blood leukocytes, pp 65 antigenemia, and viral culture. *Transplantation* 1997; 64: 108-13.
- 16.- Brytting M, Mousavi-Jazi M, Bostrom L et al. Cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes and plasma from bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 1995; 60: 961-5.
- 17.- Rickinson A B, Kieff E. Epstein-Barr Virus. En: Fields B, K.D., Howley P, et al (eds.) *Fields Virology* 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996; 2397-445.
- 18.- Hausen H Z. Epstein-Barr virus in human tumor cells. *Int Rev Exp Pathol* 1972; 11: 233-58.
- 19.- Watanabe H, Enjoji M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 1976; 38: 232-43.
- 20.- Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 2000; 53: 255-61.
- 21.- Tokunaga M, Land C E, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1250-4.
- 22.- Imai S, Koizumi S, Sugiura M et al. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9131-5.
- 23.- Levine P H, Stemmermann G, Lennette E T, Hildesheim A, Shibata D, Nomura A. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1995; 60: 642-4.
- 24.- Shinkura R, Yamamoto N, Koriyama C, Shinmura Y, Eizuru Y, Tokunaga M. Epstein-Barr virus-specific antibodies in Epstein-Barr virus-positive and -negative gastric carcinoma cases in Japan. *J Med Virol* 2000; 60: 411-6.
- 25.- Uemura Y, Tokunaga M, Arikawa J et al. A unique morphology of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 607-11.
- 26.- Selves J, Bibeau F, Brousset P et al. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in gastric carcinoma. *Histopathology* 1996; 28: 121-7.
- 27.- Galetsky S A, Tsvetnov V V, Land C E et al. Epstein-Barr-virus-associated gastric cancer in Russia. *Int J Cancer* 1997; 73: 786-9.
- 28.- Yuen S T, Chung L P, Leung S Y, Luk I S, Chan S Y, Ho J. In situ detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 1158-63.
- 29.- Harn H J, Ho L I, Chung W H, Lin J J, Lee H S, Lee W H. Epstein-Barr virus-associated typical gastric carcinoma detected by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20: 253-4.
- 30.- Ott G, Kirchner T, Muller-Hermelink H K. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994; 25: 323-9.
- 31.- Prieto M. *Cánceres Digestivos. Unidad de Cáncer*, D.U.d.l.p., Ministerio de Salud Chile, 2000.
- 32.- Corvalán A, Koriyama C, Akiba S et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with a diffuse histology: a study in one area of Chile. *Int J Cancer* 2001; 94: 527-30.
- 33.- Harn H J, Chang J Y, Wang M W et al. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum Pathol* 1995; 26: 267-71.
- 34.- Herrera-Goepfert R, Reyes E, Hernández-Ávila M et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in

- two hospitals. *Mod Pathol* 1999; 12: 873-8.
- 35.- Gulley M L, Pulitzer D R, Eagan P A, Schneider B G. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol* 1996; 27: 20-7.
 - 36.- Khanim F, Yao Q Y, Niedobitek G, Sihota S, Rickinson A B, Young L S. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 1996; 88: 3491-501.
 - 37.- Gaarenstroom K N, Melkert P, Walboomers J M et al. Human papillomavirus DNA and genotypes: prognostic factors for progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1994; 4: 73-8.
 - 38.- Aguayo F M M, Corvalán A, Muñoz M L, Koriyama C, Eizuru Y, Akiba S. Identificación de virus papiloma humano (VPH-16) en carcinoma queratinizante de pulmón. *Rev Ch Enf Resp* 2002; 18: 83-9.
 - 39.- Sánchez I, Repetto G, Saenger A. Whooping cough epidemiology in Chile (1950-1990). The adult as new reservoir of infection?. *Rev Méd Chile* 1994; 122: 339-45.
 - 40.- Cherry J D. The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr Probl Pediatr* 1984; 14: 1-78.
 - 41.- Stojanov S, Liese J, Belohradsky B H. Hospitalization and complications in children under 2 years of age with *Bordetella pertussis* infection. *Infection* 2000; 28: 106-10.
 - 42.- Ranganathan S, Tasker R, Booy R, Habibi P, Nadel S, Britto J. Pertussis is increasing in unimmunized infants: is a change in policy needed? *Arch Dis Child* 1999; 80: 297-9.
 - 43.- Perret C V P, Viviani T et al. Etiología del síndrome coqueluchoideo y rendimiento de las técnicas para el diagnóstico de *Bordetella pertussis* en pacientes hospitalizados. *Rev Chil Infect* 1999; 16: 17-26.
 - 44.- Ewanowich C A, Chui L W, Paranchych M G, Pepler M S, Marusyk R G, Albritton W L. Major outbreak of pertussis in northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescent-antibody and culture results by using polymerase chain reaction methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1715-25.
 - 45.- Buck G E. Detection of *Bordetella pertussis* by rapid-cycle PCR and colorimetric microwell hybridization. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1355-8.
 - 46.- van der Zee A, Vernooij S, Peeters M, van Embden J, Mooi FR. Dynamics of the population structure of *Bordetella pertussis* as measured by IS1002-associated RFLP: comparison of pre- and post-vaccination strains and global distribution. *Microbiology* 1996; 142: 3479-85.
 - 47.- Corvalán A L J, Aguayo F, Lobos T. Diagnóstico y cuantificación de *Bordetella pertussis* por reacción de polimerasa en cadena. XVIII Congreso Chileno de Infectología, Pucón, 23-26 agosto 2001. P32.
 - 48.- Dooley C P, Cohen H, Fitzgibbons P L et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 1989; 321: 1562-6.
 - 49.- Figueroa G, Acuña R, Troncoso M, Portell D P, Toledo M S, Valenzuela J. *Helicobacter pylori* infection in Chile. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 983-9.
 - 50.- Shimoyama T, Crabtree J E. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998; 43 Suppl 1: S2-5.
 - 51.- Telford J L, Ghiara P, Dell'Orco M et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; 179: 1653-8.
 - 52.- Telford J L, Covacci A, Ghiara P, Montecucco C, Rappuoli R. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. *Trends Biotechnol* 1994; 12: 420-6.
 - 53.- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-86.
 - 54.- Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 1994; 12: 307-19.
 - 55.- Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. Direct determination of *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1525-31.
 - 56.- Martínez A, González C, Kawaguchi F et al. *Helicobacter pylori*: cagA analysis and vacA genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1147-53.
 - 57.- Gotteland M, Corvalán A, Sarmiento F et al. Gastric permeability is not increased in children colonized by *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori*. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 750-4.
 - 58.- Atherton J C. *CagA*, the *cag* pathogenicity island and *Helicobacter pylori* virulence. *Gut* 1999; 44: 307-8.
 - 59.- Blaser M J, Pérez-Pérez G I, Kleanthous H et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-5.
 - 60.- Chávez E, Sarmiento F, López M, Kakarieka E, Vial M T, Gotteland M. Interleukin-8 levels in gastric biopsies of children colonized by *Helicobacter pylori*. *Rev Méd Chile* 1998; 126: 139-43.
 - 61.- Segal E D, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins L S. Altered states: involvement of phosphorylated *cagA* in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14559-64.
 - 62.- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori cagA* into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-500.
 - 63.- Pfaller M A. Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 312-8.
 - 64.- Mc Gowan J, B M. Infection Control Epidemiology and Clinical Microbiology, in Manual of Clinical Microbiology, Murphy P., Editor. 1995: Washington DC. p. 182-9.
 - 65.- Olive D M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-9.
 - 66.- Arbeit R. Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganism, in Manual of Clinical Microbiology, M. P, Editor. 1995: Washington DC. p. 190-208.
 - 67.- Kumari D N, Keer V, Hawkey P M et al. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 881-5.
 - 68.- Gurtler V, Barrie H D. Typing of *Staphylococcus*

- aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology* 1995; 141: 1255-65.
- 69.- Lévicán J C A, Aguayo F, Lobos T. Tipificación molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* multiresistentes mediante amplificación de la región espaciadora intergénica 16S-23S. XVIII Congreso Chileno de Infectología, Pucón, 23-26 agosto 2001. P31.
- 70.- Oliveira D C, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 180-9.
- 71.- van der Zee A, Verbakel H, van Zon J C et al. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 342-9.
- 72.- Maiden M C, Bygraves J A, Feil E et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3140-5.
- 73.- Farga V. Tuberculosis. 1992, Santiago: Editorial Mediterráneo.
- 74.- Müller N, Cleary T, Kraus G, Young A K, Spruill G, Hnatyszyn H J. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4143-7.
- 75.- Chen N H, Liu Y C, Tsao T C et al. Combined bronchoalveolar lavage and polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in smear-negative patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 350-5.
- 76.- Borun M, Sajduda A, Pawlowska I, McFadden J J, Dziadek J. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using insertion sequences IS6110 and IS990. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81: 271-8.
- 77.- Vera-Cabrera L, Hernandez-Vera M A, Welsh O, Johnson W M, Castro-Garza J. Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3499-504.
- 78.- Aguayo F R E, G.A.D.d.M.t.m.a.g.C.c.d.Q.c., Pucón, Chile, Octubre 2001. Detección de *M. tuberculosis* mediante amplificación genómica. Congreso Chileno de Química Clínica, Pucón, Chile, 2001.
- 79.- Park H, Jang H, Kim C et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus- and species-specific PCR primers. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4080-5.
- 80.- Gordon S V, Heym B, Parkhill J, Barrell B, Cole S T. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 1999; 145: 881-92.
- 81.- Carrizo A A F, Marcone P, Oyonarte M, Rodríguez E, Navarro J. Técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) para tuberculosis en lavado bronquioalveolar de pacientes Directo negativo. Cong Chil Enf Resp Valdivia, Chile, 2002.
- 82.- Hellyer T J, DesJardin L E, Hehman G L, Cave M D, Eisenach K D. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 290-5.
- 83.- Miller R F, Ambrose H E, Novelli V, Wakefield A E. Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1555-7.
- 84.- Morris A, Beard C B, Huang L. Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes Infect* 2002; 4: 95-103.
- 85.- Elvin K M, Bjorkman A, Linder E, Heurlin N, Hjerpe A. *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ* 1988; 297: 381-4.
- 86.- Larsen H H, Masur H, Kovacs J A et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 490-4.
- 87.- Maher N, Vermund S, Lasbury M, Lee C, Bartlett M, Unnasch T R. Development and evaluation of a molecular viability assay for *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1947-52.
- 88.- Olsson M, Stralin K, Holmberg H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 492-7.
- 89.- Aguayo F, Gajardo G, Fernández P, Levican J, Lobos T, Corvalán A. Desarrollo y evaluación de un método de amplificación genómica para la detección de *P. carinii*. Enviado a publicación, 2003.
- 90.- Fernández P V G, Undurraga A, Soler T et al. Diagnóstico de neumonía por *P. carinii* mediante técnica de esputo inducido. Congreso Chileno de Enfermedades Respiratorias, Valdivia, Chile, 2002.
- 91.- Torres J, Goldman M, Wheat L J et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 141-5.
- 92.- Gupta S K, Sarosi G A. The role of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Med Clin North Am* 2001; 85: 1349-65, vii.
- 93.- Qasem J A, Khan Z U, Shiji G, Mustafa A S. Polymerase chain reaction as a sensitive and rapid method for specific detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Microbiol Res* 2002; 157: 77-82.
- 94.- Reischl U, Linde H J, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N. Direct detection and differentiation of *Legionella* spp and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3814-7.
- 95.- Lobos T, Saldías F, Cartagena C, Jover E, Álvarez M, Moreno R. [*Chlamydia pneumoniae* in patients with acquired pneumonia in the Santiago of Chile community]. *Rev Méd Chile* 1998; 126: 1483-9.
- 96.- Society T B T. Guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults admitted to hospital. *Br J Hosp Med* 1993; 49: 346-50.
- 97.- Turenne C Y, Sanche S E, Hoban D J, Karlowsky J A, Kabani A M. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1846-51.
- 98.- Catten M D, Murr A H, Goldstein J A, Mhatre A N, Lalwani A K. Detection of fungi in the nasal mucosa using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 2001; 111: 399-403.

Correspondencia a:
Alejandro Corvalán R.
E-mail: biomolec@clinicalascondes.cl