

(043) "1997" Nog

1600136029 Y

UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO RUTINARIO DE LAS PATOLOGIAS INFECCIOSAS MAS FRECIENTES



de Lleida
eral

10 NOV. 1997

E: 6791

S:

Antonio Nogués Biau
Tesis Doctoral, 1997
Facultad de Medicina. Universidad de Lleida



Director

Enrique Herrero Perpiñán

Departamento de Ciencias Médicas Básicas.
Facultad de le Lleida

(043)
"1997"

NOG

0118-03060



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques

Av. Alcalde Rovira Roure, 44
25198 LLEIDA
Telf. 973-702403-702431-702400
FAX 973-702426

ENRIC HERRERO PERPIÑAN, Catedràtic de Microbiologia de la Universitat de Lleida,

FAIG CONSTAR que

la Memòria de Tesi Doctoral sobre "Utilidad de la PCR en el diagnóstico microbiológico rutinario de las patologías infecciosas más frecuentes" presentada per Antonio Nogués Biau per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Lleida reflecteix el treball realitzat per l'aspirant en el Servei d'Anàlisis Clíniques de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova i en el Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida.

Lleida, vint d'octubre de mil noucents noranta set

Enric Herrero Perpiñán
Director de la Tesi Doctoral

AGRADECIMIENTOS

- Al profesor Enrique Herrero que ha asumido la dirección de esta tesis, por su aliento y sus acertados consejos en la realización y exposición de esta tesis.

- A los doctores Miguel Falguera y Agustín Ruiz con los que he colaborado estrechamente en el diseño de parte de este estudio y que se han responsabilizado de la obtención de algunas de las muestras clínicas más complicadas.

- A todo el personal del laboratorio de Microbiología por su colaboración inestimable en el procesamiento de las muestras clínicas.

RESUMEN

La aplicación de la PCR al diagnóstico de las enfermedades infecciosas viene siendo una realidad en los últimos años. No obstante, su aplicación como instrumento diagnóstico rutinario en los laboratorios clínicos requiere de la adecuación de la técnica a las características peculiares de estos laboratorios que necesitan procesar un elevado número de muestras y dar respuesta en el menor tiempo posible a múltiples situaciones clínicas.

El objeto de este estudio es encontrar y evaluar un diseño de diagnóstico por PCR que permita conjugar las ventajas de las técnicas de amplificación con las necesidades y características de un laboratorio clínico.

Con esta finalidad hemos escogido una serie de patologías infecciosas que consideramos importantes y frecuentes en medio hospitalario (infecciones respiratorias, tuberculosis, infecciones bacterianas del SNC, infecciones en inmunodeprimidos), así como otras patologías menos frecuentes pero cuyo diagnóstico está cubierto deficitariamente por la Microbiología tradicional. Sobre este tipo de pacientes hemos aplicado y evaluado la PCR como técnica diagnóstica utilizando aquellas metodologías y equipamientos que se adaptan mejor a las características de un laboratorio clínico.

Los resultados obtenidos demuestran que la PCR, en el nivel de desarrollo en que se encuentra actualmente, mejora en todos los casos el diagnóstico obtenido por los métodos clásicos, aporta en ocasiones un método diagnóstico alternativo mucho más sencillo y rápido que aquellos, ofrece los resultados en un tiempo útil para el clínico y todo ello puede conseguirse sin alterar la actividad rutinaria del laboratorio ni los presupuestos ordinarios del mismo.

ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

BAS: Broncoaspirado

DEPC-H₂O: Agua tratada con dietilpirocarbonato

dTTP: Desoxitimidina trifosfato

dUTP: Desoxiuridina trifosfato

EDTA: Acidoetilen diamino tetraacético

kb: kilobases

LEMP: Leucoencefalopatía multifocal progresiva

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MTP: Metenamina de plata

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PTA: Punción transtorácica aspirativa

SDS: Dodecil sulfato sódico

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

SNC: Sistema nervioso central

UFC: Unidades formadoras de colonias

TABLA DE CONTENIDOS

A) INTRODUCCION	1
1.- LA MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y MOLECULAR.-	2
1.1. Hibridación con sondas de DNA.-	3
1.2. Técnicas de amplificación de genoma.-	3
2.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.-	4
2.1. Fundamento de la técnica.-	4
2.2. Identificación genotípica versus identificación fenotípica.-	8
2.3. Limitaciones del estudio genotípico.-	8
3.- EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO BASADO EN LA PCR.-	9
3.1. Determinación de la eficacia clínica en el diagnóstico por PCR.-	9
3.2. Aproximación a un diseño eficaz de diagnóstico por PCR.-	10
3.2.1. Secuencia diana y cebadores.-	10
3.2.2. Formatos de detección.-	10
3.2.3. Protocolos de extracción de DNA.-	11
3.3. Valoración global del diseño analítico.-	11
4.- EL LABORATORIO DE PCRs.-	12
4.1. La contaminación molecular.-	12
4.2. Estrategias para evitar la contaminación molecular.-	13
4.3.- Creación y utilización de protocolos.-	15
4.3.1. Recepción de muestras.-	16
4.3.2. Detección e identificación del producto.-	16
4.3.3. El control de calidad.-	17
5.- APLICACIONES DE LA PCR AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO.-	17
5.1. Infecciones respiratorias.-	18
5.2. Infecciones del sistema nervioso central.-	23
5.3. Infecciones tuberculosas.-	24
5.4. Infecciones en inmunodeprimidos.-	26

5.5. Otros agentes infecciosos.-	32
6.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.-	38
B) OBJETIVOS	40
C) MATERIALES Y METODOS	42
1.- CONDICIONES DEL LABORATORIO DE PCRs.-	43
2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.-	43
2.1. Secreciones pulmonares	44
2.2. Líquidos corporales	44
2.3. Sangre	44
2.4. Tejidos	44
2.5. Heces	45
3. EXTRACCIÓN DEL DNA.-	45
3.1. Extracción mediante ultrasonidos	45
3.2. Extracción mediante la técnica del fenol-cloroformo	45
3.3. Extracción con métodos rápidos	46
4. EXTRACCIÓN DE RNA.-	46
5. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN.-	47
5.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	47
5.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	48
5.3. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	48
5.4. <i>Legionella pneumoniae</i>	49
5.5. Infecciones bacterianas del SNC	49
5.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
5.7. <i>Pneumocystis carinii</i>	51
5.8. <i>Toxoplasma gondi</i>	52
5.9. Citomegalovirus	52

5.10. <i>Parvovirus B19</i>	52
5.11. <i>Virus JC</i>	53
5.12. <i>Herpes simplex</i>	54
5.13. <i>Enterovirus</i>	54
5.14. <i>Leishmania</i>	55
5.15. <i>Plasmodium</i>	55
6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.-	56
6.1. <i>Electroforesis</i>	56
6.2. <i>Hibridación con sondas específicas</i>	56
7. CONTROL DE CALIDAD.-	57
8. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONALES.-	57
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-	59
D) RESULTADOS	60
1. LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA.-	61
1.1. <i>Extracción con fenol-cloroformo</i>	61
1.2. <i>Extracción con métodos rápidos</i>	63
2. LA PCR EN LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS.-	64
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	64
2.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	67
2.3. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	69
2.4. <i>Legionella pneumophila</i>	71
3. LA PCR EN LAS INFECCIONES POR <i>M. tuberculosis</i>.-	72
4. LA PCR EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS DEL SNC.-	75
5. LA PCR EN LAS INFECCIONES EN INMUNODEPRIMIDOS.-	77

5.1. Infecciones por <i>P. carinii</i> _____	77
5.2. Infecciones por <i>Toxoplasma gondii</i> _____	78
5.3. Infecciones por Citomegalovirus _____	79
6. LA PCR EN LA DETECCIÓN DE OTROS AGENTES INFECCIOSOS.- _____	80
6.1. Parvovirus B19 _____	80
6.2. Virus JC _____	81
6.3. Herpes simplex _____	81
6.4. Enterovirus _____	81
6.5. Leishmania _____	82
6.6. Plasmodium _____	82
E) DISCUSION _____	83
1. ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.-86	
1.1 Utilización de ultrasonidos _____	87
1.2. Extracción con fenol-cloroformo _____	87
1.3. Extracción mediante técnicas rápidas _____	88
2. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS.- _____	89
3. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA.- _____	95
4. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS DEL SNC.- _____	97
5. UTILIDAD DE LA PCR EN EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES EN INMUNODEPRIMIDOS.- _____	99
6. UTILIDAD DE LA PCR PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE OTROS AGENTES INFECCIOSOS.- _____	103

7. ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN MOLECULAR.-	106
8. ANÁLISIS DEL COSTE ECONÓMICO DE LA PCR.-	107
F) CONCLUSIONES	109
G) REFERENCIAS	112
H) ANEXO	143

A) INTRODUCCION



1.- LA MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y MOLECULAR.-

La Microbiología clínica como ciencia aplicada al estudio de las enfermedades infecciosas se remonta a los estudios pioneros de Pasteur y Koch. Aunque muchos otros científicos anteriores realizaron numerosos descubrimientos en el campo de la Microbiología, Pasteur y Koch son considerados, ordinariamente, como los padres de la Microbiología médica.

Particular importancia tuvo en esta época la introducción por Koch de los medios sólidos, lo que posibilitó la obtención de cultivos puros, paso fundamental para el estudio etiológico de las enfermedades infecciosas. Los años que siguieron a la introducción de esta metodología son considerados como la edad de oro de la Bacteriología. Así, a principios de siglo habían sido ya descritos la mayor parte de agentes bacterianos causantes de enfermedades infecciosas.

La utilización de medios de cultivo, de diversas tinciones microbianas, de tests bioquímicos para la detección de productos finales del metabolismo y de pruebas serológicas para la identificación de antígenos microbianos han sido la práctica rutinaria en los laboratorios de Microbiología clínica hasta, prácticamente, nuestros días.

En los últimos veinticinco años el asombroso desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ha permitido progresos importantes en las técnicas de biología molecular y su aplicación al conocimiento de la biología de las células tanto procariotas como eucariotas. Estas técnicas han impactado también en los laboratorios clínicos, siendo adoptadas como herramientas muy útiles para la investigación y el diagnóstico microbiológico, constituyendo un importante complemento a las metodologías convencionales que venían siendo usadas comunmente (Peter, 1991; Thiele, 1991; Xu *et al.*, 1991; Espinosa, 1993; Ronai *et al.*, 1995).

El conjunto de técnicas de biología molecular aplicadas al estudio y diagnóstico de las enfermedades infecciosas así como el conocimiento a nivel molecular de los mecanismos de patogenicidad microbiana, reciben la denominación de Microbiología

clínica molecular. En los próximos apartados nos referiremos específicamente a las técnicas moleculares de diagnóstico microbiológico.

1.1. Hibridación con sondas de DNA.

En la década de los 70 se diseñaron las primeras técnicas de hibridación de DNA. La utilización de sondas para la detección e identificación de agentes infecciosos arranca tímidamente en los laboratorios de Microbiología clínica. Sin embargo, su falta de sensibilidad, sobre todo en la hibridación "in situ", impide su introducción masiva, quedando actualmente su uso circunscrito a determinados procedimientos muy concretos, como la confirmación de cultivos, sin que se elimine la necesidad del cultivo primario (Edberg *et al.*, 1985; Hyppia *et al.*, 1985; Forster *et al.*, 1985; Ellner *et al.*, 1988; Macario, 1990).

1.2. Técnicas de amplificación de genoma.

En octubre de 1985 se presenta en la American Society of Human Genetics Conference una nueva técnica en biología molecular: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este ingenioso método permite la amplificación "in vitro" de fragmentos de genoma, aportando las bases a un sistema enormemente sensible para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos.

De todas las técnicas básicas desarrolladas en la última década en biología molecular, ninguna ha tenido un impacto tan importante como la PCR. La técnica lleva en sí un fermento auténticamente revolucionario en la concepción de la Microbiología clínica. Por primera vez, aparece una técnica capaz de aportar todos los datos de interés microbiológico al margen de la metodología clásica: identificación y diferenciación de microorganismos a nivel de especie o cepas, detección de genes relacionados con la virulencia, resistencia a antibióticos, etc. Toda la información clínicamente útil está incluida en el genoma del microorganismo, de ahí el interés de una técnica que permite acceder a esta información y extraer, por otros métodos, todos aquellos datos que hasta ahora sólo podían obtenerse por los procedimientos clásicos.

Sin embargo, a pesar del extraordinario entusiasmo surgido alrededor de esta técnica y de la considerable inversión hecha tanto en recursos humanos como financieros para su aplicación, hoy en día la PCR se realiza rutinariamente como servicio clínico en muy pocos laboratorios (Persing, 1991; Sariola, 1993; Villa *et al.*, 1995). La razón hay que buscarla en múltiples causas: la complejidad de la técnica, la necesidad de nuevo espacio y personal especializado, el aumento importante de las cargas de trabajo que conlleva su aplicación rutinaria, los factores económicos o la falta de solución adecuada a los múltiples problemas planteados. Entre estos últimos cabe señalar la necesidad de diseñar técnicas adecuadas de extracción del DNA de los microorganismos a partir de la muestras clínicas, el problema de los falsos positivos debidos al acúmulo de amplicones, la presencia de elementos inhibidores de la polimerasa en muchos especímenes, etc.

2.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.-

Los ingredientes básicos para un método de amplificación de ácidos nucleicos fueron descritos por Kleppe en 1971, al proponer la reparación del DNA mediante un cebador dirigido hacia la síntesis extensiva de genes de t-RNAs (Klepple *et al.*, 1971). Pero este trabajo no dio aparentemente los resultados esperados de una amplificación exponencial.

En 1983 Kary Mullis, científico de la Cetus Corporation, intuyó un proceso de amplificación de ácidos nucleicos "in vitro" (Mullis, 1990) que se conoció eventualmente como la reacción en cadena de la polimerasa. En poco tiempo la técnica llegó a ser una realidad aplicable de modo generalizado, apareciendo la primera publicación sobre la misma en 1985 (Saiki *et al.*, 1985).

2.1. Fundamento de la técnica.

La PCR es un método de síntesis de DNA "in vitro", mediante el cual puede replicarse específica y exponencialmente una determinada secuencia de ácidos nucleicos a partir de un segmento de DNA inicial. Para ello se requiere de la presencia de dos

oligonucleótidos cebadores que flanquean el fragmento de DNA que ha de ser amplificado. En su forma inicial cada ciclo de PCR consiste en tres pasos:

i) un paso de desnaturalización, en el cual la secuencia de DNA es incubada a una temperatura elevada con la finalidad de que las hebras se separen y sean accesibles a la hibridación por los oligonucleótidos cebadores.

ii) un paso de anillamiento, en el cual la mezcla de la reacción es enfriada para permitir que los cebadores se anillen a sus secuencias complementarias.

iii) una reacción de extensión, realizada ordinariamente a una temperatura intermedia, en la cual los cebadores son extendidos en el molde de DNA por acción de una DNA polimerasa.

Puesto que los productos de la extensión son, así mismo, complementarios y capaces de unirse a los cebadores, los ciclos sucesivos de amplificación doblan la cantidad de la secuencia sintetizada en el ciclo anterior. El resultado es una acumulación exponencial de la secuencia diana en aproximadamente 2^n veces, representado n el número de ciclos de amplificación realizados (Fig. 1).

Una modificación de la PCR utilizada en algunas aplicaciones clínicas es la conocida como "nested-PCR", en la cual se utilizan para la reacción cuatro cebadores. En este protocolo se realiza una primera ronda de amplificación utilizando un solo par de cebadores durante 20-30 ciclos. El producto amplificado en esta primera fase es transferido a un nuevo tubo de reacción para una segunda ronda de amplificación en la que se utiliza un segundo par de cebadores específicos para la secuencia interna amplificada en la fase anterior. Esta segunda amplificación se prolonga durante 20-30 ciclos y a continuación el producto amplificado se detecta por electroforesis (Persing, 1993).

La técnica de la PCR pudo llegar a un nivel de casi automatización gracias a la caracterización y purificación de DNA polimerasas de origen microbiano (Taq, Pfu, Pwo, etc.) resistentes a las elevadas temperaturas requeridas para la desnaturalización de las hebras de DNA. El uso de las mismas evitó la necesidad (todavía existente en los

estadios iniciales de desarrollo de la técnica) de añadir una nueva dosis de DNA polimerasa entre cada dos ciclos de amplificación (Mullis, 1990).

Una técnica teóricamente tan sensible había de causar lógicamente un gran impacto en el campo de la Microbiología clínica. La amplificación biológica (el crecimiento en medios artificiales) puede ser reemplazada por la amplificación enzimática de los ácidos nucleicos "in vitro" (Persing, 1993). Aquellos microorganismos difíciles o imposibles de cultivar en medios de laboratorio e incluso nuevos gérmenes que todavía no han sido cultivados en medios artificiales, pueden, con la técnica de la PCR, ser detectados y relacionados como agentes patógenos (Relman *et al.*, 1992; Persing, 1996). También en el campo de la identificación y diferenciación de cepas puede la PCR jugar un papel notable y superior, incluso, al de los métodos convencionales (Ehrlich *et al.*, 1994).

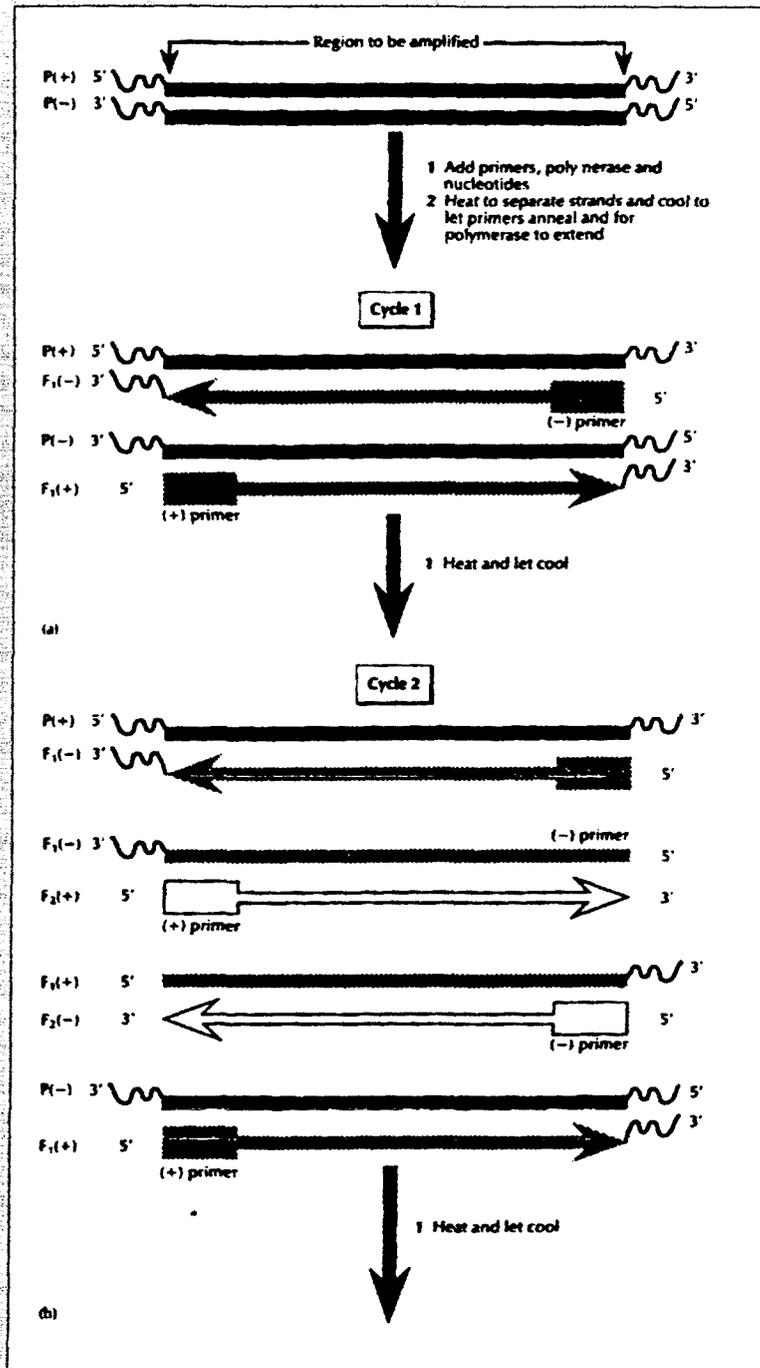


Fig. 1. Fases de la PCR. Tomado de Ehrlich (1994)

2.2. Identificación genotípica versus identificación fenotípica.

El crecimiento de un microorganismo permite evaluar sus características morfológicas, bioquímicas y metabólicas que sirven para definir grupos específicos o especies individuales. Estas características macroscópicas o macromoleculares, conocidas colectivamente como fenotipo, son adecuadas para la identificación de un gran número de microorganismos de interés clínico (Persing, 1996). Sin embargo, en muchas ocasiones, los métodos fenotípicos pueden ser problemáticos (gérmenes fastidiosos de difícil crecimiento en medios de cultivo, gérmenes de crecimiento lento, gérmenes que comparten muchos de los elementos fenotípicos analizados, etc.).

Las técnicas de amplificación enzimática permiten abordar la identificación genotípica (Persing, 1996) ofreciendo potenciales ventajas sobre los métodos fenotípicos: pueden abarcar un mayor número de datos fácilmente definibles, objetivables y cuantificables, no requieren el conocimiento previo del microorganismo para su determinación y son más rápidos y precisos.

2.3. Limitaciones del estudio genotípico.

Lógicamente, todavía hay limitaciones en los métodos genotípicos de identificación o detección de microorganismos. Así, la relación entre la persistencia del ácido nucleico de un microorganismo después de la terapéutica antibiótica y la resolución de la infección clínica deben ser mejor definidas. Además, ningún método genotípico de los comúnmente utilizados traduce exactamente todo el rango de información codificada por el cromosoma de un microorganismo. Por ello, muchas veces, si se requiere información complementaria, habrá que examinar otras secuencias del genoma. Estos son algunos ejemplos de problemas que requieren todavía estudios ulteriores para que el diagnóstico genotípico sea útil desde una perspectiva clínica.

3.- EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO BASADO EN LA PCR.-

El problema de si hay que desarrollar y utilizar un método analítico basado en la PCR para la detección de un determinado microorganismo debe ser evaluado en base a la relación coste/beneficio, teniendo en cuenta tanto la necesidad clínica como el factor económico del laboratorio. Si se trata de diseñar una nueva estrategia de PCR para un determinado diagnóstico debería haber razones muy claras y apremiantes para implicarse en este programa, debido al elevado coste tanto en tiempo como en dinero. Pero si de lo que se trata es de incorporar a la rutina analítica un análisis por PCR ya descrito y evaluado en un laboratorio equipado y entrenado para la técnica de la PCR, entonces el coste es significativamente menor.

3.1. Determinación de la eficacia clínica en el diagnóstico por PCR.

Los puntos a considerar para poner en práctica un análisis por PCR son los mismos que se contemplan en los métodos corrientes de análisis: la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos, el tiempo de obtención de resultados y el impacto final del análisis en la atención clínica del paciente. También los factores económicos deben ser tenidos en cuenta. Hay casos en que un análisis fiable por PCR influye favorablemente en el cuidado del paciente y reduce el gasto en tiempo y dinero, tanto por lo que respecta a posibles tratamientos como a la utilización de métodos estándar de diagnóstico.

La utilización de los métodos diagnósticos por PCR son más útiles cuando se pretende estudiar la muestra para la detección de uno o dos microorganismos y, por el contrario, no son adecuados en aquellas situaciones que requieren la práctica de una determinación para un amplio rango de patógenos potenciales (Ehrlich *et al.*, 1989; Ehrlich *et al.*, 1994). En estos casos los métodos de cultivo convencionales están mejor concebidos para abarcar un espectro más amplio.

Hay ejemplos en los que la PCR puede ser muy útil, comparativamente con las técnicas convencionales. Es el caso de aquellos microorganismos difíciles de cultivar o con tiempos de crecimiento prolongados, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*,

Mycoplasma spp., *Rickettsia spp.*, *Borrelia spp.*, determinados virus, etc. (Golightly *et al.*, 1990; Ehrlich, 1991; Gupta *et al.*, 1991). En otras situaciones la PCR no estaría indicada, como es el caso de muestras procedentes de frotis faríngeos o exudados de heridas, donde presumiblemente pueden encontrarse cientos de especies bacterianas diferentes. Tampoco estaría indicada su utilización en aquellos casos en los que existen ya técnicas convencionales rápidas, fiables y económicas. La decisión o no de utilizar, por tanto, una técnica diagnóstica de amplificación para la detección de un determinado microorganismo o grupo de microorganismos nos vendrá dada por la valoración conjunta de todas estas situaciones (Salfinger *et al.*, 1994)

3.2. Aproximación a un diseño eficaz de diagnóstico por PCR.

Una vez decidido que la introducción de la PCR es útil para la detección de un microorganismo en particular, entonces habrá que considerar las variables que se describen en los siguientes apartados.

3.2.1. Secuencia diana y cebadores.

En primer lugar habrá que escoger una secuencia específica y unos cebadores adecuados para su amplificación. En un laboratorio clínico asistencial resulta preferible escoger de entre la gama de cebadores ya descritos en la literatura, buscando aquellos que constaten mejores resultados a partir de estudios con un pequeño número de cepas de la especie objeto de diagnóstico clínico. Habrá que proveerse de controles positivos, que, en la mayor parte de los casos, pueden obtenerse de cultivos puros aislados en el propio laboratorio o acudiendo a las cepas de la ATCC. Si es necesario, a veces, habrá que proceder a la optimización de la reacción si la sensibilidad no es la esperada.

3.2.2. Formatos de detección.

También habrá que escoger de entre los diferentes formatos de detección del producto amplificado (Inouye *et al.*, 1990). En este sentido las técnicas de hibridación en placas de microtitulación ofrecen las mejores alternativas, dada la posibilidad de aprovechar algunos equipamientos previos de los que habitualmente disponen los laboratorios de Microbiología.

3.2.3. Protocolos de extracción de DNA.

Una vez desarrollados y optimizados todos los pasos de un determinado ensayo por PCR es necesario encontrar un protocolo de preparación de muestras que permita una buena extracción del DNA a partir de especímenes clínicos (Boom *et al.*, 1990; Buck *et al.*, 1992; Victor *et al.*, 1992; Zandotti *et al.*, 1993; Espy *et al.*, 1995). Dada la gran variedad de tipos de muestras clínicas y de las diferentes características entre ellas, este paso puede resultar el más difícil y el que requiere mayor trabajo. De hecho es en este campo de la preparación de la muestra donde invierten más esfuerzo las firmas comerciales para desarrollar equipos de extracción de DNA convenientemente protocolizados y estandarizados.

En general, los métodos de extracción utilizan elementos mecánicos, enzimáticos o detergentes para romper las paredes y membranas celulares con la finalidad de liberar el DNA o RNA que sirve de diana para la amplificación, sin introducir factores adicionales que resulten inhibidores del proceso. Dichos métodos serán descritos ampliamente más adelante en esta Memoria.

3.3. Valoración global del diseño analítico.

Un buen sistema para conocer si una técnica de PCR funciona bien en las condiciones de un laboratorio clínico consiste en utilizar un lisado procedente de una muestra clínica que se sepa que es negativa e inocularla con diluciones seriadas de un control positivo para determinar si hay presencia de factores inhibidores del proceso de amplificación. Esto permite no sólo detectar elementos inhibidores sino también evaluar la sensibilidad de la técnica, al permitir establecer cuál es el menor número de gérmenes presentes en la muestra que dan un resultado positivo en la amplificación.

Finalmente, para determinar la eficacia de un determinado análisis por PCR hay que hacer estudios paralelos y comparativos con los métodos de diagnóstico convencionales. Ello se consigue montando ensayos clínicos en los que las muestras del paciente son analizadas en paralelo por los métodos estándar y por PCR. Los resultados obtenidos por la PCR deben valorarse por su capacidad para aportar una información

significativamente mejor que los métodos tradicionales en términos de sensibilidad, especificidad, consistencia, reproducibilidad y acortamiento del tiempo de obtención de resultados.

4.- EL LABORATORIO DE PCRs.-

El establecimiento de una unidad de diagnóstico por PCR en un laboratorio de Microbiología clínica comporta un planteamiento serio y riguroso por lo que respecta a infraestructura y equipamiento con la finalidad de que los resultados obtenidos sean auténticamente fiables y su interpretación no deje lugar a dudas.

4.1. La contaminación molecular.

La capacidad de amplificar una pequeña secuencia de DNA es un arma de doble filo. Aporta la posibilidad de abordar análisis con un grado de sensibilidad sin parangón, pero al mismo tiempo implica que cualquier fragmento de DNA diana contaminante pueda servir también como molde de amplificación. Dada la gran sensibilidad de la PCR, una sola molécula de DNA diana puede ser amplificada hasta el punto de poder ser detectada por los formatos habituales de hibridación. Así pues, evitar la contaminación a partir de ácidos nucleicos exógenos es vital para obtener resultados consistentes y correctos (Espy *et al.*, 1993).

La fuente más común de contaminación del DNA no es precisamente la proveniente de otra muestra clínica o del control positivo sino los amplicones obtenidos en amplificaciones previas del microorganismo que nos interesa. Este tipo de contaminación molecular ha dado en llamarse "carryover" para diferenciarla de la contaminación microbiana (Ehrlich *et al.*, 1994). El bajo peso molecular del DNA amplificado es fácilmente aerosolizado al abrir los tubos o al pipetear, lo que puede resultar en una contaminación insidiosa de todos los reactivos, equipamientos e incluso del personal. Es por eso que hay que ser muy riguroso en el seguimiento de todas aquellas indicaciones y sugerencias aportadas para la planificación de un laboratorio clínico de PCRs.

4.2. Estrategias para evitar la contaminación molecular.

Existe una serie de métodos de trabajo y de procedimientos que disminuyen significativamente la contaminación molecular durante las pruebas de PCR. Entre estas estrategias cabe destacar las siguientes:

(i) Pipetas adecuadas.

Durante el proceso normal de pipeteo se producen siempre fenómenos de microaerosolización, depositándose residuos moleculares en la punta del vástago de las pipetas convencionales de desplazamiento por aire. Para evitar esta fuente de contaminación hay que evitar el uso de pipetas convencionales y utilizar siempre pipetas de desplazamiento positivo o bien usar pipetas convencionales con puntas estériles desechables resistentes a los aerosoles. Además, para evitar la contaminación con amplicones procedentes de reacciones anteriores es necesario que todo el instrumental, equipamiento e incluso el personal que ha estado en contacto con material amplificado no sea utilizado o intervenga en los procedimientos de preamplificación de las muestras clínicas (Innis *et al.*, 1990; Kitchin *et al.*, 1990).

(ii) Procedimientos bioquímicos y físicos.

Además de estas prácticas físicas de aislamiento existen algunos procedimientos bioquímicos para reducir el problema de la contaminación molecular. Uno de estos métodos consiste en la utilización de dUTP en vez de dTTP, que da como resultado la generación de DNA amplificado que contiene residuos de uracilo en lugar de residuos de timidina. Este DNA que contiene uracilo está sujeto a una modificación enzimática por la uracil-N'-glicosidasa, que actúa eliminando residuos de uracilo de la cadena de DNA. Como quiera que el DNA tratado con este enzima se fragmenta en el paso de desnaturalización, ya no sirve como molde para amplificaciones ulteriores (Longo *et al.*, 1990; Thornton *et al.*, 1992).

El otro sistema consiste en someter la mezcla preparada (excepto los nucleótidos) para la realización de la PCR a irradiación con luz ultravioleta. Esta crea dímeros de

timidina en el DNA, inactivando la capacidad de éste para servir como molde de amplificación (Fairfax *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 1991).

(iii) Controles adecuados.

La utilización de controles apropiados tanto positivos como negativos es crítica para la correcta interpretación de los resultados y para detectar la presencia o ausencia de posibles contaminantes de DNA (de Wit *et al.*, 1993).

(iv) Elementos inhibidores.

Si es importante la eficaz detección de los falsos positivos, no lo es menos la de los falsos negativos. Algunas muestras, así como algunos procedimientos de manipulación de las mismas e incluso los equipamientos, pueden contener o introducir factores inhibidores que reducen la eficiencia de la PCR (Wang *et al.*, 1992; Meier *et al.*, 1993; Rys *et al.*, 1993; Amicosante *et al.*, 1995 ; Wiedbrank *et al.*, 1995). Se conocen algunos moléculas que inhiben la acción de la DNA-polimerasa amplificadora, por ejemplo, el grupo hemo de la sangre, la heparina, los polisacáridos, algunos detergentes utilizados en la extracción de los ácidos nucleicos (SDS), o el EDTA. Además, algunas muestras clínicas contienen abundantes inhibidores (por ejemplo, el líquido cefalorraquídeo, la orina o el esputo), aunque las moléculas implicadas no han sido identificadas (Ehrlich *et al.*, 1994).

Para detectar posibles inhibidores endógenos presentes en la muestra es conveniente realizar una coamplificación en cada análisis de PCR inoculando un control positivo en un tubo aparte con la muestra a estudiar (Cone *et al.*, 1992). Algunas sustancias inhibidoras, como el grupo hemo, pueden ser neutralizadas añadiendo a la reacción transferrina bovina (Lin *et al.*, 1990). Finalmente, es importante escoger un buen método de extracción y purificación del DNA que impida que estas sustancias inhibidoras se encuentren presentes en la solución de DNA sometido a la reacción de amplificación.

(v) El espacio.

La distribución del espacio en una unidad de PCR dentro de un laboratorio clínico constituye también un problema que debe ser tratado con seriedad. Existen diseños altamente sofisticados que confieren un alto grado de seguridad pero que, lógicamente, suponen una inversión económica no desdeñable (Ehrlich *et al.*, 1994). Por lo menos, la unidad de PCR debe cumplir unos requerimientos mínimos. Así, es básico disponer de, al menos, dos habitaciones o cubículos completamente separados. En uno de ellos se realizará todo el trabajo de preamplificación, extracción de DNA, preparación de stocks de reactivos y preparación de la mezcla para la PCR. En el segundo se realizará todo el trabajo de amplificación y postamplificación, ubicando en esta zona los termocicladores, equipamiento para hibridación del producto amplificado, sistema de electroforesis, etc. Es importante que cada una de estas áreas disponga de material propio y no haya nunca intercambio de equipamiento.

(vi) El personal.

Por último, cabe realizar una referencia al personal que va a trabajar en la unidad de PCR. Si tenemos en cuenta que una técnica exquisita y depurada es la mejor manera de prevenir muchos de los problemas que puede plantear la instauración rutinaria de la PCR en un laboratorio clínico, habrá que concluir que el personal que trabaje en esta área ha de ser capaz de extremar las precauciones en la manipulación del material biológico. Lo ideal sería disponer de personas diferentes para trabajar en cada una de las dos áreas, sin intercambiarse de una zona a otra. Si esto no es posible, al menos han de darse las condiciones para que la persona pueda lavarse y cambiarse de ropa antes de pasar del área "sucia" o de postamplificación a otras áreas.

4.3.- Creación y utilización de protocolos.

Para conseguir buenos resultados en el diagnóstico clínico por PCR es necesario dotarse de unos buenos protocolos que contemplen el manejo de las muestras clínicas, así como de una puesta a punto de las técnicas de amplificación y el análisis del producto amplificado (Dragon, 1993). A continuación, se tratan con cierto detalle estos aspectos.

4.3.1. Recepción de muestras.

Todas las muestras deben recibirse y procesarse en la unidad de PCR en el tiempo adecuado para evitar la lisis celular y la degradación de los ácidos nucleicos. Esto es particularmente importante para aquellas muestras de las que debe ser extraído RNA para la transcripción reversa, ya que el RNA es mucho más lábil que el DNA.

Las muestras de tejido requieren de la lisis por SDS y posterior digestión por proteinasa K, seguido de sucesivas extracciones con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Aunque en estos casos los procedimientos rápidos de lisis no son aconsejables (Ehrlich *et al.*, 1994), sin embargo existen en la actualidad algunos procedimientos que pueden dar buenos resultados (McHale *et al.*, 1991; Crowe *et al.*, 1993; Pring-Akerblom *et al.*, 1994).

Las muestras de sangre total deben ser transportadas a temperatura ambiente y no deben ser congeladas hasta que se haya realizado la separación de sus componentes (Ciulla *et al.*, 1988; Gustincich, 1991). Por su parte, los frotis de mucosa deben ser practicados con instrumentos de plástico; el aluminio puede inhibir el proceso de la PCR (Ehrlich *et al.*, 1994). Algunas muestras como los esputos, secreciones respiratorias o exudados de heridas, necesitan ser clarificadas antes de someterlas a un proceso de lisis. Esto puede realizarse añadiendo a la muestra KOH al 2% o N-acetil-L-cisteína (Brisson-Noël *et al.*, 1989; Hance *et al.*, 1989).

4.3.2. Detección e identificación del producto.

La detección del producto de PCR se realiza convencionalmente mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa con bromuro de etidio incorporado y visualización en un transiluminador de luz ultravioleta. Alternativamente, la tinción con bromuro de etidio puede ser posterior a la electroforesis.

La hibridación mediante el uso de una sonda específica es otro método de detección, más sensible que la electroforesis y que aporta, además, un elevado grado de especificidad (Keller *et al.*, 1990; Langraf *et al.*, 1991; Langraf *et al.*, 1991; Mantero *et al.*, 1991). De entre los protocolos de hibridación habrá que escoger aquellos que se adaptan

más a las características y metodologías de un laboratorio clínico. Alguno de estos métodos lo describiremos en detalle más adelante.

4.3.3. El control de calidad.

Los protocolos incluidos en la práctica en una unidad de PCRs no deben en modo alguno pasar por alto todo lo referido al control de calidad (Persing *et al.*, 1993).

El chequeo de las puntas de pipeta para constatar su resistencia a los aerosoles o la presencia de sustancias inhibitoras, la comprobación del grado de pureza de los oligonucleótidos utilizados, el control de la precisión en la temperatura de termocicladores, baños, bloques térmicos, incubadores, etc. son algunos ejemplos que debe contemplar el control de calidad rutinario.

En todas las reacciones de amplificación se incluirán controles positivos y negativos. Una recomendación general es que el número de controles negativos debe ser del 5% del total de reacciones (Persing *et al.*, 1993). Siempre que se realice una doble amplificación ("nested") cada muestra se alternará con un control negativo.

5.- APLICACIONES DE LA PCR AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO.-

Los resultados de los análisis de diagnóstico molecular para los agentes infecciosos dependen en gran manera de una buena selección y del momento de recogida de las muestras, así como de los métodos de recolección y preparación de las mismas. Los organismos infecciosos son susceptibles a muchos reactivos que se utilizan para su procesamiento, y pueden encontrarse en diferentes sitios anatómicos y en diferentes líquidos y tejidos corporales durante la evolución natural de las enfermedades infecciosas. En general, la detección e identificación de un agente infeccioso tiene más peso en la formulación de un diagnóstico que el fracaso en detectarlo. Por tanto, las muestras deben obtenerse del sitio donde más probablemente encontraremos el agente infeccioso según el particular estadio de la enfermedad, y deben ser manipuladas de la forma más favorable para la supervivencia del germen y/o para el análisis del DNA o RNA (Ehrlich *et al.*, 1994).

Una de las ventajas de utilizar la PCR en el diagnóstico clínico es que tan sólo una pequeña cantidad de muestra es suficiente para conseguir una adecuada amplificación de una parte del genoma del germen a investigar. Sin embargo, la muestra obtenida debe ser adecuada. Las normas generales de obtención y recogida de muestras que habitualmente reflejan los manuales de Microbiología clínica pueden aplicarse en el caso de la PCR. Así, la muestra ha de ser representativa del lugar de la infección, por ejemplo, esputo en lugar de saliva, frotis de la zona profunda de la herida en lugar de la superficie, etc. También hay que tener cuidado en evitar la contaminación del espécimen, utilizando material estéril y precauciones asépticas. Las muestras deben ser bien cerradas y transportadas al laboratorio para su rápido procesamiento, antes de que se degraden por la acción de las DNAsas o RNAsas. Finalmente, se requiere una buena información acerca de la sospecha diagnóstica y enfermedades subyacentes con la finalidad de planificar la estrategia experimental del diagnóstico molecular para los posibles agentes infecciosos.

A partir de estas premisas, podemos plantearnos el diagnóstico clínico por PCR. Las posibilidades son, prácticamente, ilimitadas. Actualmente sería difícil encontrar un microorganismo de interés clínico que no tuviera descrito en la literatura un protocolo diagnóstico por PCR. Ante la imposibilidad de hacer referencia a todos aquellos microorganismos sobre los que podemos aplicar técnicas diagnósticas por PCR, nos limitaremos a describir los antecedentes bibliográficos de aquellos que van a ser objeto de estudio en los apartados siguientes de la Memoria.

5.1. Infecciones respiratorias.

El espectro etiológico de las infecciones de vías respiratorias bajas es muy amplio, por lo que el planteamiento de su diagnóstico por PCR debe ser considerado detenidamente. El diseño de la estrategia para aproximarnos a un diagnóstico efectivo ha de pasar forzosamente por la identificación de la frecuencia con que los agentes patógenos están implicados en este proceso infeccioso. En el caso de la neumonía comunitaria los microorganismos bacterianos más frecuentemente implicados son *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, cubriendo, entre los tres, más del 70% del diagnóstico etiológico (Ortquist *et al.*, 1990;

Moine *et al.*, 1994). El diagnóstico de la neumonía por PCR deberá, pues, incluir estos tres microorganismos.

i) *Streptococcus pneumoniae*. En casi todas las series estudiadas el neumococo aparece como el principal agente causal de neumonía comunitaria, con independencia de la selección de pacientes o de las técnicas diagnósticas utilizadas. Ordinariamente, el diagnóstico definitivo de la neumonía neumocócica requiere el aislamiento del germen a partir de la sangre o del líquido pleural, pero los cultivos suelen ser positivos en menos del 30% de los pacientes con neumonía neumocócica (Kallin *et al.*, 1983). Por otra parte, el diagnóstico serológico es inviable dado el gran número de serotipos existentes, cada uno de los cuales tiene una inmunogenicidad diferente.

Con el fin de evaluar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la neumonía neumocócica se han realizado varios estudios utilizando diferentes cebadores.

Rudolph y colaboradores diseñaron dos juegos de cebadores en un sistema de "nested-PCR", los cuales amplifican regiones de los genes de la neumolisina y autolisina, respectivamente. La sensibilidad fue evaluada utilizando DNA neumocócico purificado, llegando a detectar 10 fg de DNA o la equivalencia a 4,3 genomas de neumococo (Rudolph *et al.*, 1993). Esta sensibilidad no fue evaluada sobre muestras clínicas por lo que sus resultados no pueden extrapolarse a la sensibilidad clínica de la técnica.

Los cebadores diseñados para la amplificación del gen PBP2 (que codifica una proteína con afinidad a penicilina) de *Streptococcus pneumoniae* (Muñoz *et al.*, 1991) fueron aplicados y evaluados para la detección de neumococo en muestras clínicas por Nogués *et al.*, (1994).

En la detección de neumococo en muestras de esputo Gillespie y colaboradores utilizaron una técnica de PCR que amplifica una porción del gen *lytA*. El análisis fue capaz de detectar entre 10 y 100 UFC/ml en agua destilada y $1,4 \times 10^4$ UFC/ml en muestras simuladas de esputo (Gillespie *et al.*, 1994)

Friedland *et al.* (1994) utilizaron dos cebadores para amplificar el gen *poII* de *Streptococcus pneumoniae* descrito por Dowson *et al.* (1989). Los niveles de

sensibilidad alcanzados por este método se cifran en 2 fg de DNA purificado, superando la sensibilidad descrita por Rudolph *et al.*, (1993). La aplicación de la PCR sobre neumococo presente en frascos de hemocultivo dio una sensibilidad de 5×10^4 UFC/ ml. En este estudio no aparecen datos obtenidos a partir de muestras clínicas para el diagnóstico de la neumonía neumocócica.

Salo *et al.*, (1995) diseñaron una nueva PCR para amplificar un fragmento del gen de la neumolisina. Su aplicación sobre 20 muestras de suero de otros tantos pacientes con hemocultivos positivos para neumococo permitió el diagnóstico por PCR en todos los casos. Este nivel de sensibilidad clínica sólo pudo conseguirse aplicando una estrategia de "nested-PCR", lo que permitió incrementar en 1000 veces la sensibilidad de la primera amplificación.

En todos los estudios citados faltan series más amplias de aplicación de la PCR sobre muestras clínicas no simuladas o procedentes de pacientes no seleccionados previamente, para evaluar la utilidad real de la PCR en el diagnóstico de la neumonía neumocócica.

ii) *Mycoplasma pneumoniae*. Constituye el segundo agente etiológico bacteriano, en orden de frecuencia, de la neumonía comunitaria. El diagnóstico de la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* se realiza por cultivo no convencional (lo que requiere hasta tres semanas) o más comúnmente, por técnicas serológicas que permitan demostrar un incremento significativo del título de anticuerpos entre dos muestras de suero separadas por un intervalo de tiempo de, al menos, dos semanas. Estas características del microorganismo hacen que la PCR pueda ser una alternativa interesante para mejorar su diagnóstico microbiológico.

La primera aplicación de la PCR para la detección de genoma de *Mycoplasma pneumoniae* fue realizada por Bernet y colaboradores en 1989. La amplificación de un segmento de DNA de 144 pb, específico de *Mycoplasma pneumoniae*, permitió la detección del germen a partir de frotis de garganta de hámsters infectados experimentalmente. Sus resultados mejoraron los obtenidos por cultivo de las mismas muestras (Bernet *et al.*, 1989).

La utilización de estos mismos cebadores por Skakni *et al.* (1992) sobre muestras clínicas de pacientes pediátricos confirmó la mayor sensibilidad de la PCR respecto al cultivo en la detección de micoplasma .

Estudios de sensibilidad llevados a cabo por Buck *et al.* (1992) con otro tipo de cebadores sobre muestras clínicas simuladas permitieron evaluar la sensibilidad de la PCR, detectando entre 1 y 10 microorganismos totales, mientras que el cultivo detectó 10^3 organismos. Estos resultados confirmaron que la PCR puede ser un método rápido y sensible para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en especímenes clínicos.

La aparición posterior de nuevos estudios (Luneberg *et al.*, 1993; Marmion *et al.*, 1993) reafirmó la superioridad de la PCR frente al cultivo, pero los autores encontraron que la detección del microorganismo en frotis faríngeos no siempre se correlaciona con enfermedad real del paciente debido a la existencia de portadores sanos. Esto plantea la necesidad de confirmar el resultado de la PCR con una respuesta inmunológica que confirme la relación entre los dos tipos de datos. También se plantea el problema de cuál ha de ser la muestra adecuada para el diagnóstico de neumonía por micoplasma. A la misma conclusión llegan otros autores que comparan los diferentes métodos para el diagnóstico de la infección por *Mycoplasma pneumoniae*. En resumen, la PCR se muestra como un método eficaz para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras clínicas (Jeroen *et al.*, 1994; Kuppeveld *et al.*, 1994; Blackmore *et al.*, 1995; Falguera *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1996), pero hacen falta más estudios para correlacionar el resultado de la PCR con la enfermedad del paciente.

iii) *Chlamydia pneumoniae*. Desde su reconocimiento como especie nueva, dentro del género *Chlamydia* (Grayston *et al.*, 1989), han sido numerosos los estudios que lo han confirmado como uno de los microorganismos más frecuentes en infecciones respiratorias (Grayston, 1992; Almirall *et al.*, 1993; Nogués *et al.*, 1995).

El aislamiento de *Chlamydia pneumoniae* es difícil, a pesar de disponer de líneas celulares que permiten la multiplicación de la bacteria. Las técnicas serológicas, por otra parte, plantean problemas de reacciones cruzadas entre las diferentes especies de clamidias. Es por ello que una técnica de detección directa como la PCR puede aportar

mejoras decisivas que superen el problema de la falta de especificidad de la serología y no tengan los inconvenientes del cultivo (largo tiempo de obtención de resultados y falta de sensibilidad en pacientes tratados previamente con antibióticos).

Los primeros resultados de la aplicación de la PCR para la detección de *C. pneumoniae* fueron obtenidos por Campbell y colaboradores. El estudio de 38 muestras de pacientes (frotis de garganta) en los que se había aislado *C. pneumoniae* dieron resultados también positivos por PCR en todos los casos, ofreciendo una sensibilidad al menos igual a la del cultivo (Campbell *et al.*, 1992).

En los años siguientes varios autores han utilizado la PCR para el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae* utilizando como muestras frotis faríngeos o nasofaríngeos (Black *et al.*, 1994; Gaydos *et al.*, 1994; Ouchi *et al.*, 1994; Yamada, 1995), lavados de garganta (Pruck *et al.*, 1995), broncoaspirados (Gaydos *et al.*, 1993; Maas *et al.*, 1994) o secreciones pulmonares obtenidas por punción transtorácica (Nogués *et al.*, 1995; Falguera *et al.*, 1996).

En todos estos casos se demuestra la utilidad de la PCR para el diagnóstico clínico de la infección por *C. pneumoniae*, mejorando los resultados obtenidos por el cultivo. El tiempo de obtención de estos resultados (a veces en el mismo día) permite que puedan ser utilizados para la instauración inicial del tratamiento antibiótico del paciente, a diferencia de lo que sucede con el cultivo.

iv) *Legionella pneumophila*. En los brotes de legionelosis los estudios de detección del microorganismo deben orientarse en dos direcciones: el paciente (para confirmar el diagnóstico clínico) y la fuente de infección (que debe ser localizada para cortar rápidamente el brote). La posibilidad de disponer de una técnica rápida y eficaz para detectar el agente causal tiene gran importancia tanto por lo que afecta al interés del enfermo para su correcto tratamiento como desde el punto de vista de la salud pública para detectar, atajar y prevenir los brotes epidémicos por *Legionella*.

En este sentido, se muestran eficaces los estudios de detección de *Legionella* en el agua mediante la técnica de la PCR (Starnbach *et al.*, 1989; Loutit *et al.*, 1990; Jernigan *et al.*, 1996). También la aplicación de la PCR sobre muestras clínicas demuestra mayor

grado de sensibilidad que la detección de antígeno en orina (Maiwald *et al.*, 1995). Así mismo, la realización de la PCR sobre lavados broncoalveolares o sobre muestras de suero tomadas en la fase aguda de la enfermedad ofrece resultados que mejoran los obtenidos por cultivo o por técnicas serológicas (Jaulhac *et al.*, 1992; Lindsay *et al.*, 1994).

La inclusión de la PCR en el diagnóstico de la neumonía por *Legionella* puede beneficiar enormemente al paciente al ofrecerle un diagnóstico etiológico más rápido y la posibilidad de recibir, desde el inicio de la enfermedad, un tratamiento correcto. Aunque la incidencia de *L. pneumophila* es muy variable según las diferentes zonas, se trata de un organismo fastidioso y cuyo cultivo requiere tres o más días para su aislamiento, por lo que su inclusión en un diagnóstico por PCR queda ampliamente justificada en aquellos casos de sospecha clínica.

5.2. Infecciones del sistema nervioso central.

La meningitis bacteriana es una afectación grave del SNC que puede responder a un número diverso de agentes microbianos. La rápida detección e identificación del germen causal en el LCR es de gran importancia para poder aplicar, desde el principio, un tratamiento antibiótico adecuado. El aislamiento por cultivo es el método de elección para su correcto diagnóstico, pero aquel puede verse alterado por factores externos, como los tratamientos previos o condiciones inadecuadas de transporte, almacenamiento o procesamiento de la muestra que afecten a la viabilidad de la bacteria.

La primera estrategia de PCR diseñada por Ketel y colaboradores para el diagnóstico de la meningitis por *Haemophilus influenzae* demostró una sensibilidad equiparable a la del cultivo (Ketel *et al.*, 1990). Estudios similares utilizando la PCR para el diagnóstico de la meningitis meningocócica muestran la superioridad de aquella en el diagnóstico de pacientes que han recibido tratamiento previo (Kristiansen *et al.*, 1991; Ni *et al.*, 1992; Radstrom *et al.*, 1994).

Greisen *et al.* (1994) diseñaron una nueva PCR más acorde con las necesidades clínicas. Utilizaron cebadores comunes que amplifican el gen del rRNA 16S capaces de amplificar una banda común en tamaño para la mayor parte de bacterias que podemos

encontrar en el LCR como agentes causales de meningitis, a la vez que diseñaron una serie de sondas específicas para meningococo, neumococo, *Haemophilus*, estreptococo del grupo B, estafilococo, *Listeria*, etc. que permiten la identificación del producto amplificado, pudiendo con ello aportar el diagnóstico etiológico en una única reacción (Greisen *et al.*, 1994).

La utilización de una PCR que combine cebadores universales para la amplificación de cualquier bacteria y sondas específicas para la identificación de los microorganismos que habitualmente causan meningitis bacteriana, puede aportar el beneficio de un diagnóstico más rápido que el cultivo, sin verse afectado su resultado por la administración de tratamientos antibióticos previos.

5.3. Infecciones tuberculosas.

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* es la que ha sido objeto de más amplio estudio por las técnicas de amplificación de DNA. El incremento de casos de tuberculosis en los últimos años, la importancia del diagnóstico precoz para evitar su diseminación y la emergencia de cepas resistentes a los tuberculostáticos de primera línea avalan la necesidad de mejorar el diagnóstico microbiológico. Ordinariamente el diagnóstico de la tuberculosis se hace mediante aislamiento e identificación del microorganismo, lo que, en este caso, puede llevar entre tres y ocho semanas.

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la utilidad clínica de la PCR en la detección de la infección tuberculosa. La presencia de ácido nucleico de un solo microorganismo puede ser detectada por este método. La amplificación y análisis subsiguientes puede completarse en uno o dos días y, además, se trata de un método de detección directa que aporta información sobre la presencia del microorganismo.

Una de las secuencias de amplificación más utilizadas en la literatura es la descrita por Eisenach y colaboradores. Se trata de la secuencia de inserción IS6110 que se repite en el cromosoma de *M. tuberculosis* y es específica del complejo tuberculoso (Eisenach *et al.*, 1991). Los estudios realizados con los cebadores de esta secuencia demuestran un alto grado de sensibilidad y especificidad de la PCR si la comparamos con el cultivo (Eisenach *et al.*, 1991; Brissen *et al.*, 1991; Schluger *et al.*, 1994; Hashimoto

et al., 1995; Querol *et al.*, 1995). Su aplicación sobre líquidos pleurales (de Wit *et al.*, 1992), líquidos cefalorraquídeos (Miørner *et al.*, 1995; Richeldi *et al.*, 1995; Pfyffer *et al.*, 1996) o sobre sangre periférica (Condos *et al.*, 1996; Folgueira *et al.*, 1996) constituye una forma importante de potenciar los métodos clásicos en la detección de estas localizaciones tuberculosas difíciles de diagnosticar desde el punto de vista microbiológico convencional.

También la tuberculosis infantil ha sido objeto de estudio por técnicas de PCR (Delacourt *et al.*, 1995). Sin embargo, los resultados de la PCR por sí sola son insuficientes para diagnosticar la tuberculosis en los niños debido a la falta de especificidad en la detección de la enfermedad clínica (Smith *et al.*, 1996).

Se han descrito variaciones en la sensibilidad de la PCR motivadas por los diferentes métodos de extracción de DNA (Folgueira *et al.*, 1993; Kox *et al.*, 1994), así como diferencias en los resultados obtenidos sobre las mismas muestras procesadas por diferentes laboratorios (Noodhoek *et al.*, 1994), lo que indica que todavía son necesarios más estudios para precisar aquellos protocolos que ofrezcan resultados mejores y más reproducibles.

En los últimos años ha aparecido comercializada una técnica de PCR (Roche Amplicor PCR *Mycobacterium tuberculosis*) que aporta una buena estandarización del método, lo que conlleva a una alta reproducibilidad entre laboratorios. Existen numerosos trabajos que han evaluado esta técnica (Gleason *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1995; Schirm *et al.*, 1995; Bergmann *et al.*, 1996; Castuyvels *et al.*, 1996) con muy buenos resultados.

La PCR se perfila como una excelente técnica para el diagnóstico de la tuberculosis, pero la variabilidad de los resultados publicados en cuanto a su sensibilidad y especificidad, así como el problema de interpretación de algunos resultados no confirmados por el cultivo o la clínica, hacen que la técnica no pueda constituirse en alternativa a los métodos clásicos sino como un método de diagnóstico complementario y aplicable a pacientes o situaciones clínicas cuidadosamente seleccionadas (Doern, 1996).



5.4. Infecciones en inmunodeprimidos.

El progreso de la medicina en el tratamiento de muchas enfermedades, el incremento de pacientes que sobreviven gracias a la implantación de órganos y, sobre todo, la extensión creciente de enfermos afectados por el virus del SIDA, hacen que actualmente se tenga que asistir a un elevado número de pacientes inmunodeprimidos. Todo ello ha propiciado la aparición de una serie de problemas médicos prácticamente inexistentes hace tan sólo unos años.

La aparición en estos grupos de pacientes de infecciones por gérmenes oportunistas obliga a replantear muchas técnicas de diagnóstico microbiológico. La mayoría de estos gérmenes no son fácilmente abordables por las técnicas clásicas o, si lo son, el grado de sensibilidad en su detección suele ser bajo. Infecciones por *Toxoplasma*, *Pneumocystis*, *Leishmania*, Citomegalovirus, micobacterias no tuberculosas, etc. han pasado de ser problemas esporádicos a convertirse en realidades cotidianas, para las cuales la PCR puede aportar su poder y sensibilidad diagnósticos.

i) *Pneumocystis carinii*. La neumonía por *P. carinii* es una complicación frecuente en los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en aquellos que están infectados por el virus del SIDA. Aunque el tratamiento profiláctico ha reducido la incidencia de la neumonía por *Pneumocystis*, sin embargo su presentación es aún bastante común. El diagnóstico definitivo requiere la evidencia del microorganismo en el esputo, lavados broncoalveolares o punciones transparietales. Para ello se realizan tinciones especiales como la metenamina de plata, el azul de toluidina o mediante técnicas de inmunofluorescencia (Murray *et al.*, 1995).

Con el fin de mejorar la sensibilidad diagnóstica de estas técnicas se ha estudiado la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la infección por *Pneumocystis* en pacientes inmunodeprimidos. Algunos autores han encontrado mayor sensibilidad de la PCR que la tinción con azul de toluidina o la fluorescencia sobre esputo u otras secreciones respiratorias (Olsson *et al.*, 1993; Eisen *et al.*, 1994; Elvin, 1994; Roux *et al.*, 1994; Armbruster *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1995; Leibovitz *et al.*, 1995). La tinción con

metenamina de plata también se muestra menos sensible y específica que la PCR sobre muestras respiratorias o punciones transparietales (Falguera *et al.*, 1994).

La aplicación de la PCR sobre muestras de sangre o suero para detección de fungemia en casos de neumonía por *Pneumocystis* se ha demostrado eficaz, ofreciendo una buena alternativa a los métodos invasivos en el diagnóstico de la neumonía por *P. carinii* (Schluger *et al.*, 1991; Atzori *et al.*, 1995). En cambio otros autores han llegado a concluir que la aplicación de la PCR sobre muestras de sangre no tiene valor para el diagnóstico de la neumonía por dicho agente (Tamburrini *et al.*, 1996).

La sensibilidad de la PCR puede verse afectada por la utilización de cebadores diferentes (Atzori *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995). Para perfilar el grado de estas diferencias son necesarios nuevos estudios, dadas las características de estandarización actual de la técnica.

La introducción de variaciones en el diseño de las técnicas de PCR permite mejorar sus resultados y acercarla más a las condiciones y protocolos de los laboratorios clínicos (Tamburrini *et al.*, 1993; Cartwright *et al.*, 1994). O'Learly *et al.* (1995) diseñaron un sistema de PCR semicuantitativo con la finalidad de poder utilizar la técnica para seguir la respuesta del paciente al tratamiento. El estudio de estos autores realizado sobre ratones requiere nuevas evaluaciones sobre muestras de pacientes para confirmar su utilidad clínica.

De los trabajos anteriores cabría generalizar que aunque las técnicas clásicas son más rápidas de ejecución y relativamente más económicas que la PCR, ésta es más sensible en la detección de *P. carinii* sobre todo tipo de muestras clínicas, por lo que puede ser una buena alternativa en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por este microorganismo, siempre que se utilicen cebadores y un diseño técnico adecuado.

ii) *Toxoplasma gondii*. La infección por *T. gondii* es una de las más comunes en el hombre. La dos formas de presentación, congénita y adquirida, pueden ser inaparentes o producir una amplia variedad de manifestaciones clínicas. Después de su multiplicación en la puerta de entrada, el parásito se disemina por vía hematogena invadiendo órganos y tejidos. El desarrollo de una respuesta inmunológica apropiada hace que los trofozoitos

desaparezcan de los tejidos, formándose en éstos quistes que persisten de por vida en estado latente. La reactivación de la infección latente se da con frecuencia en pacientes inmunodeprimidos, pudiendo producirse infecciones respiratorias de vías bajas, afectaciones oculares o infecciones del SNC.

El diagnóstico microbiológico de la toxoplasmosis se realiza ordinariamente por serología, pero ésta tiene muchas limitaciones ya que la presencia de anticuerpos no diferencia entre una infección aguda o pasada (las IgMs pueden persistir meses o incluso años). Es por ello que el diagnóstico definitivo solo puede realizarse por cultivo en medios celulares, lo que puede llevar hasta tres semanas para obtener un resultado positivo. Huskinson y colaboradores, en estudios experimentales en ratones, encontraron que durante la infección aguda o reactivación de una infección latente se produce una diseminación del parásito en sangre y orina (Huskinson *et al.*, 1989). En ambos tipos de muestras se ha conseguido aislar el germen en pacientes con toxoplasmosis aguda, confirmándose así estos datos experimentales (Nogués *et al.*, 1993).

Las limitaciones de las técnicas clásicas en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por *T. gondii* ha hecho que la aparición de una técnica de elevada sensibilidad como la PCR en la detección directa del parásito haya sido contemplada con extraordinario interés. El primer diseño de PCR para la detección directa de *T. gondii* fue realizado por Burg y colaboradores utilizando para su amplificación una secuencia diana repetida 34 veces en el genoma del microorganismo (gen B1). A partir de un lisado de células consiguieron amplificar y detectar el DNA de un solo microorganismo. La sensibilidad de la técnica permitió detectar el DNA purificado de tan solo 10 parásitos en presencia de 10^5 leucocitos humanos (Burg *et al.*, 1989).

Con el fin de mejorar la sensibilidad de la técnica en el diagnóstico clínico se han utilizado para su amplificación secuencias más repetitivas (110 veces) del DNA ribosómico (Guay *et al.*, 1993). Así mismo, James *et al.* (1996) y Joss *et al.* (1997) estudiaron las condiciones de transporte y almacenamiento de las muestras que pueden afectar a la sensibilidad tanto de la PCR como del diagnóstico por cultivo o por inoculación en ratones. Los diferentes métodos de extracción y purificación del DNA también pueden influir en los niveles de sensibilidad (Grob *et al.*, 1992).

En general, la aplicación de la PCR para el diagnóstico de la toxoplasmosis se muestra superior al cultivo y a la inoculación en ratones. Esta mayor sensibilidad se pone de manifiesto tanto en el diagnóstico de infecciones del SNC (Ven *et al.*, 1991; Parmley *et al.*, 1992; Thulliez *et al.*, 1992; Lamoril *et al.*, 1996) como en infecciones pulmonares (Bretagne *et al.*, 1993) o en infecciones congénitas (Grover *et al.*, 1990; Ven *et al.*, 1991; Thulliez *et al.*, 1992; Hohlfeld *et al.*, 1994; Knerer *et al.*, 1995; Fuentes *et al.*, 1996).

El seguimiento de la eficacia terapéutica ha podido ser realizado por PCR coincidiendo la negativización de sus resultados con la mejoría clínica de los pacientes (Aubert *et al.*, 1996). Aunque el estudio es muy limitado (dos pacientes con trasplante renal), ofrece en principio buenas posibilidades para la monitorización terapéutica.

Bretagne *et al.* (1995) diseñaron una PCR cuantitativa aplicándola sobre lavados broncoalveolares de pacientes con SIDA infectados por *T. gondii*. Esta estrategia permite no sólo realizar el diagnóstico mediante la detección del parásito sino también precisar la severidad del cuadro pulmonar.

iii) Citomegalovirus. La prevalencia de citomegalovirus es alta en todas las regiones del mundo. Los estudios de seroprevalencia indican que entre los 20 y 40 años el 40-90% de la población posee anticuerpos frente a citomegalovirus. La primoinfección es seguida por la excreción persistente o intermitente del virus durante meses o años, estando el paciente perfectamente sano (Ho, 1982).

El virus puede propagarse por secreciones respiratorias o contacto sexual si se halla presente en la saliva, secreciones cervicales y semen. Estudios en adultos y niños que han recibido transfusiones de sangre procedentes de donantes con anticuerpos frente a citomegalovirus revelan la importancia de esta fuente de infección. Los pacientes inmunodeprimidos pueden desarrollar infección por citomegalovirus por fuentes endógenas. La infección latente puede ser activada en aquellos pacientes que tienen disminuida la inmunocompetencia o pueden ser infectados cuando reciben transfusiones sanguíneas o al ser sometidos a trasplantes de órganos (Rand *et al.*, 1978).

Aproximadamente un 1% de recién nacidos contraen una infección congénita por citomegalovirus, aunque la mayor parte de ellos no manifiestan signos de enfermedad en el momento del parto. En general se admite que la primoinfección es inaparente y tan solo en pocos casos aparecen manifestaciones clínicas. Un caso aparte lo constituyen los pacientes inmunodeprimidos o los receptores de transplante de órganos. Estos pacientes pueden presentar cuadros graves de infecciones respiratorias, hepatitis o episodios de rechazo del órgano transplantado, de ahí la gran importancia de la detección del virus en todos estos casos.

El diagnóstico de las infecciones por citomegalovirus se hace ordinariamente por aislamiento en cultivos celulares de fibroblastos humanos (lo que puede llevar entre 3 y 30 días) o bien mediante detección de antígeno por técnicas de inmunofluorescencia o por serología. Una proporción sustancial de personas normales excretan citomegalovirus, por lo que la documentación de su papel etiológico requiere la demostración de un incremento en el título de anticuerpos o la presencia del virus en tejidos o secreciones previamente negativos. La PCR se ha unido en los últimos años a este grupo de técnicas diagnósticas de la infección por citomegalovirus, pero la interpretación de sus resultados positivos tampoco se libra de los problemas del cultivo o de la detección de antígeno. Con todo, dada la gran importancia de la detección del virus en pacientes transplantados o inmunodeprimidos, son numerosos los estudios aparecidos evaluando la técnica de la PCR como un instrumento útil en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes infectados por citomegalovirus.

La utilidad de la PCR en la detección de citomegalovirus en muestras clínicas ha sido valorada por diversos autores como un método rápido y sensible, ofreciendo la misma sensibilidad que el cultivo sobre muestras de orina y saliva (Greenfield *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1993; Daiminger *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994; Siritantikorn *et al.*, 1994) o sobre muestras de sangre (Einsele *et al.*, 1991; Prosch *et al.*, 1992; Drouet *et al.*, 1993). Algunos autores cuestionan si la detección de citomegalovirus en sangre por PCR es signo de enfermedad (Rowley *et al.*, 1991; Delgado *et al.*, 1992; Zipeto *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994). Para otros autores, en cambio, la demostración de la persistencia de la viremia es indicativa de enfermedad (Drouet *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1995; Peiris *et al.*, 1995). Algunos autores sugieren que la detección simultánea de

citomegalovirus en diferentes muestras o localizaciones en un paciente puede ser indicativo de infección activa (Xu *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994).

La introducción de variaciones técnicas, como la PCR cuantitativa, pueden ayudar a interpretar correctamente sus resultados positivos (Schafer *et al.*, 1993; Zipeto *et al.*, 1993; Peiris *et al.*, 1995; Gallez *et al.*, 1997). Por otra parte el diseño de una PCR para detectar de forma más precisa la replicación de citomegalovirus puede ser útil para el diagnóstico de pacientes con infección activa (Meyer *et al.*, 1994).

Menos problemas de interpretación suelen tener los resultados de la PCR en el diagnóstico de la infecciones del SNC, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos donde el hallazgo de citomegalovirus en LCR se correlaciona muy bien con la enfermedad (Cinque *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1992; Clifford *et al.*, 1993; Studhal *et al.*, 1995).

Particularmente útil se muestra la PCR en el cribaje de donantes de sangre u otros órganos (Bitsch *et al.*, 1992; Stanier *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1995), lo que la hace muy eficaz para el control de donantes y receptores.

La detección de citomegalovirus por PCR en secreciones respiratorias (lavados broncoalveolares o muestras obtenidas por otras técnicas invasivas) mejora los resultados de los métodos clásicos y ofrece una buena correlación clínica (Cathomas *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 1993; Liesnard *et al.*, 1994).

La infección congénita por citomegalovirus, que requiere una valoración rápida del paciente, no obtenible con los métodos clásicos, es fácilmente detectada por la PCR (Dong *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1995; Numazaki *et al.*, 1996; Ozono *et al.*, 1997), convirtiéndose en un excelente método diagnóstico alternativo.

El problema más importante que presenta la PCR es la variabilidad de sus resultados entre los diferentes laboratorios, lo que dificulta la comparación y correlación de datos. Este hecho suele atribuirse a la falta de uniformidad en la metodologías, aunque también entre laboratorios experimentados en técnicas de biología molecular y que utilizan la misma metodología se ha detectado este problema, como se demuestran en un estudio multicéntrico utilizando las mismas muestras clínicas (Grundy *et al.*, 1996). Esto

indica que hay que hacer más esfuerzos todavía en encontrar métodos más reproducibles y más estandarizados con el fin de conseguir una buena homogeneidad de los resultados de la PCR en la detección de citomegalovirus.

5.5. Otros agentes infecciosos.

La disponibilidad de una técnica diagnóstica como la PCR en un laboratorio clínico permite plantearse el diagnóstico de muchos agentes infecciosos que hasta ahora eran prácticamente inabordables en servicios ordinarios de Microbiología (Relman *et al.*, 1992). Entre ellos tenemos los siguientes ejemplos:

i) **Parvovirus B19.** Identificado en 1975, se le relaciona con un espectro de manifestaciones clínicas que varían de acuerdo con la edad y el estado inmunológico de los pacientes afectados. Es el agente causal del eritema infeccioso del niño. En el adulto normal es responsable de cuadros agudos de artritis bilateral o artritis crónicas. Debido a su marcado tropismo por los precursores de la eritropoyesis, puede inducir crisis de anemia aplásica en pacientes con enfermedades hemolíticas de base y también se le ha relacionado con el "hydrops fetalis" en los casos de infección congénita.

A diferencia de otros microorganismos, las posibilidades del diagnóstico microbiológico en el caso de Parvovirus B19 son limitadas, concretándose prácticamente en las técnicas serológicas. La PCR viene a cubrir un hueco importante en la metodología diagnóstica de la infección por parvovirus. Su aplicación sobre muestras clínicas demuestra que la técnica es específica y que puede alcanzarse un alto grado de sensibilidad (Rogers *et al.*, 1991). Si se compara con los resultados obtenidos por la serología, la PCR es más sensible ya que detecta infección en pacientes con ausencia de IgM positivas (Fridell *et al.*, 1992; Sevall *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1992; Carriere *et al.*, 1993). Los niveles de sensibilidad permiten detectar menos de 10 copias de genoma (Cassinotti *et al.*, 1993). La aplicación de una técnica "nested-PCR" incrementa todavía más el nivel de detección (Yamakawa *et al.*, 1995).

La PCR se muestra muy útil en la detección de parvovirus en los concentrados de plasma, donde cuadruplica la sensibilidad de las técnicas de hibridación (Zakrzewska *et al.*, 1992; McOmish *et al.*, 1993). Así mismo, los resultados del cribaje por PCR de

donantes de sangre han permitido detectar la presencia del virus con una frecuencia del 0.6% frente al 0.03% utilizando otros métodos (Yoto *et al.*, 1995).

Otra aplicación importante de la PCR la encontramos en el diagnóstico prenatal, detectando la infección intrauterina relacionada con el "hydrops fetalis" que puede ocasionar abortos o muerte del feto (Schwartz *et al.*, 1992; Torok *et al.*, 1992; Nikkari *et al.*, 1995; Savey *et al.*, 1995).

En pacientes inmunodeprimidos la PCR es, prácticamente, la única técnica diagnóstica eficaz (Musiaii *et al.*, 1993; Fridell *et al.*, 1995), dados los pobres resultados que ofrece la serología en este tipo de pacientes.

ii) **Virus JC.** Es el agente causal de la leucoencefalitis multifocal progresiva (LEMP), caracterizada por la desmielinización de la sustancia blanca, lo que se traduce en déficits neurológicos en los pacientes afectados (Richardson, 1961). Desde 1982 la mayor parte de casos de LEMP aparecen en pacientes afectados por el SIDA.

El diagnóstico se hace ordinariamente por biopsia cerebral, la única técnica confirmatoria de la enfermedad mediante detección del virus por microscopía electrónica, hibridación "in situ" o técnicas inmunohistoquímicas (Silverman *et al.*, 1965). Los estudios de seroprevalencia demuestran que el virus JC está ampliamente distribuido en la población. Entre un 50-75% de las personas adultas tienen anticuerpos, por lo que la serología no resulta una técnica útil para el diagnóstico de la enfermedad. El virus es también difícil de cultivar en cultivos celulares.

La PCR permite la amplificación de pequeñas cantidades de DNA del virus a partir de muestras clínicas. En muestras obtenidas por autopsia o biopsia cerebrales se consiguió la detección del virus por esta técnica (Telenti *et al.*, 1990). También se ha utilizado el LCR para confirmar el diagnóstico de la enfermedad en pacientes afectados por LEMP (Henson *et al.*, 1991), aunque la sensibilidad clínica sobre LCR no sobrepasa el 50%. De todas maneras, la inocuidad de la técnica la hace preferible, de entrada, a la opción por técnicas tan agresivas como la biopsia cerebral. La utilización de la PCR sobre leucocitos de sangre periférica en pacientes inmunocompetentes ha permitido demostrar la persistencia del virus en el núcleo de las células sanguíneas en pacientes

sanos (Dorries *et al.*, 1994), sugiriendo la posibilidad de una reactivación endógena del virus en pacientes sometidos a largos períodos de inmunosupresión.

El papel de la PCR en el diagnóstico de LEMP ofrece todas las ventajas respecto a cualquier otra técnica diagnóstica disponible en el momento actual, por lo que podría plantearse como la técnica de elección en los laboratorios clínicos.

iii) Herpes simplex. El espectro de enfermedades asociadas a infecciones causadas por herpes simplex es muy amplio, produciendo desde manifestaciones clínicas moderadas, como en la afectación genital, labial, ocular y cutánea, hasta manifestaciones graves e incluso letales, como en la infección herpética neonatal, la meningitis y la meningoencefalitis herpéticas (Corey *et al.*, 1986).

El diagnóstico microbiológico de la infección herpética no suele plantear problemas con los métodos convencionales, ya que se trata de un virus que se replica fácilmente en cultivos celulares y cuyos efectos citopáticos aparecen en 24-48 horas. También las técnicas de detección de antígeno son válidas, sobre todo en lesiones cutáneas, oculares o genitales. La aplicación de la PCR en el diagnóstico de las infecciones herpéticas puede ser complementaria a los métodos clásicos, y sólo en determinadas circunstancias pueden aportar información adicional o mejorar la sensibilidad diagnóstica.

Dada la capacidad de latencia del virus herpes simplex después de la primoinfección, es posible detectar por PCR genoma del virus en personas sanas, lo que puede cuestionar el significado clínico del hallazgo por PCR. Cantin *et al.* (1994) detectaron secuencias de DNA del virus en sangre periférica y en células de médula ósea de donantes clínicamente sanos. La utilización de este tipo de muestras, que pueden ser muy útiles para la selección de donantes, puede inducir a errores de interpretación clínica en otras circunstancias. Otros autores, en cambio, observaron que en la reactivación del herpes labial se produce un fenómeno de diseminación transitoria en una minoría de pacientes (7 de 34), lo que no encontraron en pacientes sin manifestaciones clínicas (Brice *et al.*, 1992).

Donde puede aportar resultados beneficiosos la utilización de la PCR es en las infecciones del SNC. La existencia actualmente de una terapéutica eficaz para el

tratamiento de las encefalitis herpéticas plantea la necesidad de un diagnóstico rápido y fiable, lo que puede conseguirse con elevado grado de sensibilidad con la PCR. Diversos estudios han demostrado su utilidad como método rápido y no invasivo sobre LCR para el diagnóstico rutinario de las infecciones del SNC por el virus herpes simplex (Skoldenberg, 1991; Rozenberg *et al.*, 1991; Aslanzadeh *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1994).

iv) Enterovirus. Los enterovirus son responsables de un gran número de síndromes clínicos que pueden aparecer en el hombre. El género Enterovirus engloba a cinco grupos: poliovirus, coxsackievirus A y B, echovirus y los más recientes conocidos como enterovirus, con más de 70 serotipos (Melnick, 1990). Muchas de las enfermedades producidas por los enterovirus son benignas pero hay afecciones graves del SNC y formas paralizantes que pueden ocasionar secuelas importantes.

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por enterovirus se realiza ordinariamente por cultivos celulares a pesar de las limitaciones de éstos, motivadas por la imposibilidad de algunos serotipos de replicarse en el cultivo o por el lento crecimiento en ellos de otras cepas que necesitan de varias semanas para la aparición de los efectos citopáticos. Las técnicas de detección de antígeno no son viables dado el gran número de serotipos. Tampoco la serología resulta una técnica especialmente útil para el diagnóstico de laboratorio.

La identificación de las secuencias genómicas comunes a todos los enterovirus ha permitido diseñar técnicas de PCR como herramientas diagnósticas de las infecciones por enterovirus, particularmente aquellas que afectan al SNC. Los primeros ensayos fueron realizados por Rotbart en 1990 (Rotbart, 1990a), quien seguidamente aplicó la técnica al diagnóstico de las meningitis por enterovirus en pacientes pediátricos con buenos resultados (Rotbart, 1990b).

Estudios más amplios han evaluado la utilidad de la PCR en la detección de enterovirus en LCR, obteniéndose mejores y más rápidos resultados que el cultivo (Glimaker *et al.*, 1993; Rotbart *et al.*, 1994; Sawyer *et al.*, 1994; Andreoletti *et al.*, 1996; Lina *et al.*, 1996). En el diagnóstico de la infección neonatal por enterovirus,

utilizando como muestras clínicas suero y orina, la PCR también ofrece mayor sensibilidad que el cultivo (Abzug *et al.*, 1995).

Constatados los potenciales defectos de los métodos clásicos y valorando los resultados obtenidos por los diferentes autores en la detección de enterovirus por técnicas de PCR, puede considerarse a ésta no sólo como una alternativa diagnóstica complementaria sino como la técnica de elección en el laboratorio clínico.

v) *Leishmania*. La leishmaniasis humana puede ser producida por una docena de especies, todas las cuales se transmiten por las moscas de la arena. En todos los casos el parásito reside como amastigote intracelular dentro de las células del mamífero hospedador. Las especies de *Leishmania* provocan diferentes cuadros clínicos: infecciones cutáneas, monocutáneas y viscerales (Magill *et al.*, 1993). Esta última forma de presentación afecta al sistema reticuloendotelial pudiendo ser una infección grave y, a veces, mortal. El diagnóstico de laboratorio se realiza mediante hallazgo de las formas amastigotes en frotis teñidos de médula ósea o punción esplénica. Puede también aislarse el parásito en medios líquidos especiales y tras varios días de incubación.

La leishmaniasis visceral (Kala-azar) es una enfermedad infecciosa frecuente en los países en vías de desarrollo, pero el incremento de los viajes internacionales y la epidemia mundial de SIDA han hecho que esta enfermedad esté también presente entre los países desarrollados. De hecho, en numerosas ocasiones se plantea el clínico su diagnóstico diferencial, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (Berenguer *et al.*, 1989).

La detección del parásito por PCR fue ensayada por primera vez por Rodgers y colaboradores en 1990 (Rodgers *et al.*, 1990). También se ha utilizado la PCR en estudios epidemiológicos con el objeto de conocer más a fondo la diseminación de la enfermedad y los mecanismos para su control (Blackwell, 1992; Pérez *et al.*, 1994).

En el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea se ha demostrado que la PCR es un método más sensible que el estudio histopatológico o que el cultivo, y que en el diagnóstico de procesos cutáneos crónicos donde aparece una cantidad de parásitos muy reducida puede ser el método de elección (Laskay *et al.*, 1995).

Nuzum *et al.*, (1995) utilizaron sangre periférica para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%. La posibilidad de realizar el diagnóstico a partir de sangre periférica es de gran interés ya que evita al paciente el tener que sufrir métodos tan agresivos como la punción de médula ósea o esplénica.

La optimización de una PCR para el diagnóstico rutinario de leishmaniasis en pacientes afectados de SIDA permitió comparar los siguientes resultados de sensibilidad: 98% para la PCR, 81% para el cultivo y 51% para el examen directo (Costa *et al.*, 1996).

En resumen, aunque todavía no son muy numerosos los estudios clínicos de diagnóstico de leishmaniasis por PCR, parece evidente que los resultados obtenidos hasta el momento indican que ésta puede ser la técnica de elección por su sensibilidad, rapidez en la obtención de resultados y fiabilidad.

vi) *Plasmodium*. La malaria es una enfermedad causada por un parásito del género *Plasmodium*. Existen cuatro especies (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* y *P. ovale*) que infectan a los humanos. La malaria es un serio problema de salud en amplias regiones de América del Sur, América Central, África y Asia. Este grave problema, lejos de disminuir, va en aumento debido sobre todo a la aparición de resistencias al DDT en los mosquitos y a la aparición de parásitos resistentes a la cloroquina (Bruce-Chwatt, 1979).

La detección precisa del *Plasmodium* tanto en sangre como en el mosquito vector, así como la identificación de la especie parasitaria, son de gran importancia para la instauración de un tratamiento individualizado. Existen algunos procedimientos de laboratorio para identificar las especies de *Plasmodium* (examen microscópico de extensiones de sangre, técnicas inmunológicas, etc.). Sin embargo, la PCR aporta una sensibilidad diagnóstica superior a la de las otras técnicas.

Desde la primera aplicación de la PCR para el estudio de la malaria (Waters *et al.*, 1989) se han ido sucediendo los estudios que demuestran la superioridad de la técnica sobre los métodos convencionales, tanto en su aplicación en niños como en adultos con índices de parasitemia más bajos (Felger *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1995). También la

PCR presenta mejores resultados en la detección de malaria de etiología mixta cuyo diagnóstico de laboratorio puede ofrecer alguna dificultad.

Especialmente útil podría ser la PCR en nuestro medio o en otras áreas donde la malaria no es endémica y el número de casos que llegan a nuestros laboratorios a lo largo del año es muy reducido. La falta de hábito y experiencia suficiente en el diagnóstico de la malaria, basado principalmente en el estudio morfológico, hace que a veces no sea fácil no tanto la detección del parásito cuanto la identificación de la especie o el diagnóstico de infecciones mixtas. La sensibilidad, especificidad y capacidad de discernir entre la diferentes especies de *Plasmodium* por parte de la PCR constituyen una ayuda inestimable para aquellos laboratorios de Microbiología clínica donde no suele disponerse de un experto parasitólogo.

6.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.-

Recogiendo las consideraciones de Persing (1991), pueden hacerse algunas predicciones relacionadas con el impacto de la PCR y otras técnicas de amplificación en los laboratorios de Microbiología.

En primer lugar, estas técnicas tendrán su mayor impacto en la detección de patógenos para los que los sistemas de cultivo son lentos, inconvenientes, peligrosos, extremadamente caros o simplemente no disponibles. De esta forma podrá ampliarse el repertorio diagnóstico en los laboratorios clínicos.

En segundo lugar, la introducción de las técnicas de amplificación creará en los laboratorios clínicos una demanda de profesionales entrenados en estas técnicas. Sólo desde muy recientemente los programas de formación de los microbiólogos clínicos incluyen la docencia en técnicas de biología molecular.

En tercer lugar, deberán desarrollarse programas de formación continuada que completen la formación de los microbiólogos que, en estos momentos, no han recibido una formación en técnicas moleculares, aportándoles una visión realista del poder y las limitaciones de estas técnicas en el diagnóstico clínico.

Finalmente, habrá que establecer la provisión de estándares nacionales para controlar los métodos, asegurar la calidad y mejorar los programas de diagnóstico molecular.

B) OBJETIVOS

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.-

Los objetivos del trabajo descrito en la presente Memoria son los siguientes:

i) Elaborar diseños de PCR convencionales adaptados por el propio laboratorio (la llamada PCR "casera") que puedan ser utilizados rutinariamente para la detección de un amplio número de microorganismos en diversas situaciones clínicas, especialmente con el objetivo de que sean capaces de absorber el número de muestras que genera la práctica diaria hospitalaria sobre las que se pretenda a aplicar esta técnica diagnóstica, y que permitan el aprovechamiento y reutilización de algunos recursos, infraestructuras y protocolos de trabajo que tradicionalmente encontramos en los laboratorios clínicos.

ii) Evaluar, en este contexto, la utilidad de la PCR en el diagnóstico clínico determinando su sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo sobre microorganismos usuales en la práctica clínica hospitalaria, comparando dichos aspectos cuando ello sea posible con los resultados obtenidos por las técnicas convencionales.

iii) Determinar aquellos casos en los que la PCR puede considerarse como la técnica de elección, aquellos en los que puede desplazar sin perjuicio a los métodos tradicionales y aquellos en los que su utilización puede o debe ser complementaria.

iv) Analizar y valorar la incidencia e importancia de la contaminación molecular en una unidad de PCRs a lo largo de los años, así como los métodos más eficaces para su prevención.

v) Estudiar y valorar la relación coste/beneficio que comporta la creación de una unidad de PCRs para el diagnóstico microbiológico rutinario en un laboratorio clínico.

**C) MATERIALES Y
METODOS**

1.- CONDICIONES DEL LABORATORIO DE PCRs.-

La unidad de PCRs está ubicada dentro del laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y consta de dos cubículos o habitaciones separadas. En una de ellas se realiza todo el trabajo de preparación de reactivos y las técnicas de extracción del DNA de las muestras clínicas. El equipamiento de esta zona consiste en una cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar), dos microcentrifugas de velocidad fija (Sigma 112, 13000 rpm), una microcentrifuga refrigerada de velocidad variable (Sigma 2K 15, 15000 rpm), un bloque térmico de dos temperaturas (95°C y 60°C), un baño térmico, un baño de ultrasonidos (Bransonic modelo B 2200), dos juegos de pipetas de desplazamiento positivo y otro de pipetas convencionales equipadas con puntas resistentes a aerosoles. Esta zona dispone además de un congelador a -70°C y otro a -20°C.

En el segundo cubículo se realiza todo el trabajo de amplificación, electroforesis y técnicas de hibridación para la detección e identificación del producto amplificado. En él están ubicados dos termocicladores IHB 2024 (Cherlyn Electronics Ltd.) para tubos Eppendorf de 1,5 ml, un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) para tubos de 0,2 ml, un equipo de electroforesis horizontal, un transiluminador de luz ultravioleta, un lavador automático de placas de microtitulación, un espectrofotómetro para lectura de placas, un congelador a -20°C y dos juegos de pipetas similares a las anteriormente descritas.

El equipamiento de cada una de estas zonas es para uso exclusivo en las mismas y no se realizan intercambios de material de una zona a otra.

2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.-

La obtención de las muestras clínicas se realizaba siguiendo la metodología convencional para la práctica de estudios microbiológicos (Murray *et al.*, 1995).

Los pasos de preparación de las muestras, previos a la extracción del DNA o RNA, diferían según el tipo de muestra clínica:

2.1. Secreciones pulmonares.

Se realizaba la licuefacción de la muestra mediante procesamiento con NaOH al 2% someténdola a la acción de un homogeneizador (IUL Masticator) durante 3 minutos. A continuación se centrifugaba durante 5 minutos y el sedimento se utilizaba para la extracción del DNA.

2.2. Líquidos corporales.

Se centrifugaban a 10000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se utilizaba para la extracción del DNA.

2.3. Sangre.

Las técnicas de procesamiento de la sangre dependían del tipo de fracción de la misma que se pretendía estudiar. Para el estudio de la sangre total, se recogía la misma en un tubo de extracción con EDTA como anticoagulante, se separaban entre 200-400 μ l y se procesaban para la extracción del DNA. El estudio de la fase leucocitaria se hacía separando la misma mediante centrifugación en un gradiente de concentración (Histopaque, Sigma); dicha fase se lavaba 2-3 veces con tampón fosfato salino (pH 7,4) preparándola así para la extracción del DNA. El plasma se preparaba mediante centrifugación del tubo de EDTA a 1500 rpm durante 5 minutos, separándolo así del resto de fracciones.

2.4. Tejidos.

Los tejidos obtenidos por biopsia se cortaban en pequeñas porciones de 25-30 mg, se mezclaban con 0,5-1 ml de agua destilada o tampón PBS y se sometían a trituración en un mortero hasta conseguir la disgregación total de los componentes tisulares, procediendo a continuación a la extracción del DNA.

2.5. Heces.

Se tomaba con un asa microbiológica una pequeña porción de la parte más representativa (moco, sangre o pus) y se resuspendía en 1-2 ml de agua destilada o tampón PBS, procediendo a la realización de 2-3 lavados mediante centrifugación. El sedimento se resuspendía en 0,5 ml de PBS y se reservaba para la extracción del DNA o RNA.

3. EXTRACCIÓN DEL DNA.-

Para la extracción del DNA se utilizaron tres métodos diferentes cuyas ventajas y resultados serán evaluados en esta Memoria.

3.1. Extracción mediante ultrasonidos.

Este método se aplicó para la obtención del DNA de los controles positivos y de aquellas muestras clínicas con sospecha de un inóculo microbiano elevado. En un tubo Eppendorf se colocaba 1,5 ml de la muestra clínica o de la suspensión microbiana a procesar y se sometían a la acción de los ultrasonidos en un desmembrador sónico durante 15 min a 25-30°C. A continuación se calentaba la muestra a 95°C durante 5-10 min, se centrifugaba (2-3 min) y se aspiraba el sobrenadante conteniendo el DNA preparado para la realización de la PCR.

3.2. Extracción mediante la técnica del fenol-cloroformo.

Se seguía básicamente la técnica descrita en Sambrook *et al.* (1989). En concreto, se tomaban 1,5 ml de muestra y se efectuaban 3-4 lavados con agua destilada. A continuación, se resuspendía el sedimento en 300 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 0,01 M pH 7,8, EDTA 5 mM, SDS al 0,5%), añadiendo 1,5 µl de proteinasa K (25 mg/ml) e incubando 1 hora a 37°C. Se mezclaba la muestra con 400 µl de fenol-cloroformo y se centrifugaba 5 minutos a 12000 rpm a fin de separar la fase orgánica de la fase acuosa. Se colocaba ésta última en un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadían 0,6 volúmenes de

alcohol isopropílico en presencia de cationes monovalentes (acetato sódico y cloruro sódico a una concentración de 0,3 M y 0,2 M respectivamente), dejando precipitar los ácidos nucleicos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaba el tubo durante 10 minutos, se decantaba y lavaba el sedimento de ácidos nucleicos con 1 ml de alcohol etílico al 70%, volviendo a centrifugar otros 10 minutos. Se decantaba de nuevo y se procedía a la evaporación de los restos de alcohol.

3.3. Extracción con métodos rápidos.

Para este tipo de extracción se emplearon los kits comerciales QIAamp Blood Kit y QIAamp Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden), que utilizan un tampón de lisis optimizado junto a proteinasa K u otra proteasa. La muestra (200 µl) mezclada con este tampón se incubaba a 70°C durante 10 minutos y a continuación se procedía a la precipitación de los ácidos nucleicos con etanol o isopropanol con repetidos lavados y centrifugados a través de unas pequeñas columnas de sílica-gel. Todo el proceso se realizaba siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

4. EXTRACCIÓN DE RNA.-

Las moléculas de RNA son extremadamente susceptibles a la degradación por las RNAsas presentes en tejidos, líquidos corporales y, en general, en cualquier entorno ambiental, por lo que este hecho debe ser considerado en todo el proceso de manipulación y extracción del RNA microbiano de las muestras clínicas (Sambrook *et al.*, 1989).

En la extracción del RNA de enterovirus se han seguido los métodos descritos por Rotbart *et al.* (1993). Se colocaban 100 µl de la muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, añadiendo en el siguiente orden 40 unidades de RNAsina (Promega), 2,5 µl de SDS al 20% y 100 µl de fenol-cloroformo. Después de agitar y centrifugar se separaba la fase superior acuosa. El resto de la fase orgánica se mezclaba con otro tampón de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y SDS al 0,5%). Después de la centrifugación, se recogían las dos fases acuosas en un tubo y se añadía acetato amónico

hasta una concentración final 2M, junto con 2,5 volúmenes de etanol, dejando precipitar los ácidos nucleicos durante al menos 2 horas a -20°C. A continuación se centrifugaba en frío durante 30 minutos a 13000 rpm, se decantaba el etanol y se dejaba evaporar el resto durante 30 minutos. El sedimento se resuspendía con 50 µl de agua tratada con (DEPC-H₂O).

5. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN.-

Todas las reacciones de amplificación se realizaban en tubos Eppendorf de 1,5 ml en el que se colocaba 100 µl de aceite mineral, 50 µl de muestra y 50 µl de mezcla de los siguientes reactivos 2× : 10 µl de tampón de PCR (Gibco BRL), 3 µl de MgCl₂ 50 mM, 2 µl de una mezcla de dNTP a 10 mM cada uno, 1 µl de cada uno de los cebadores (100 pmol por reacción), 0.4 µl de Taq DNA Polimerasa (Gibco BRL) y agua destilada hasta completar 50 µl. La síntesis de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, así como la síntesis y marcaje con biotina de las sondas de hibridación utilizadas en este estudio fueron realizadas por Cruachem Ltd (Glasgow, U.K.). La selección, en cada caso, de los cebadores para los diferentes diagnósticos por PCR se hizo en base a los datos de sensibilidad y especificidad aportados por otros autores tal como se indica a continuación.

5.1. *Streptococcus pneumoniae*.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron los cebadores Pn2x up (5' CGTGGGACTATTTATGACCGAAATGG) y Pn2x down (5' TTCCAGCACTGATG GAAATAAACATATTA) descritos por Dowson *et al.* (1989) que amplifican el gen PBP2x de *Streptococcus pneumoniae*, dando lugar a un producto de 1,5 kb (Fig. 2). Los tubos con 50 µl de la muestra a estudiar y 50 µl de la mezcla de reactivos 2× se colocaban en un termociclador programado de la manera siguiente: 1 ciclo de 4 min a 95°C; 40 ciclos de 1,5 min a 95°C, 1,5 min a 56°C y 2 min a 70°C; y un 1 ciclo de 10 min a 70°C .

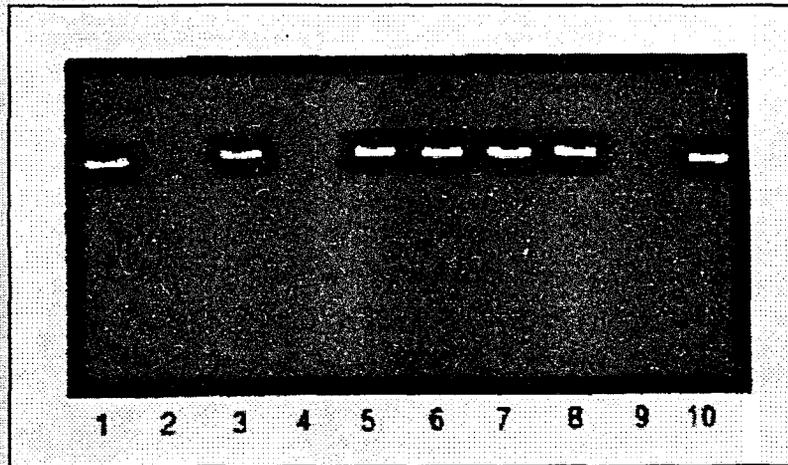


Fig. 2.- Producto amplificado de *S. pneumoniae* (1,5 kb) La calle 1 contiene una suspensión sonicada de neumococo como control positivo. En la calle 2 está situado el control negativo y las calles 3-10 corresponden a muestras clínicas.

5.2. *Mycoplasma pneumoniae*.

La amplificación del DNA de *M. pneumoniae* se realizaba mediante los cebadores MP5-1 (5'GAAGCTTATGGTACAGGTTGG) y MP5-2 (5'ATTACCATCCTTGTTGTAAG) descritos por Bernet *et al.* (1989). La reacción se realizó en un termociclador programado de la siguiente manera: 1 ciclo de 4 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (1 min), y un ciclo final de 72°C durante 10 min.

5.3. *Chlamydia pneumoniae*.

Para la PCR frente a *Chlamydia pneumoniae* se utilizaron los cebadores HL1 (5'GTTGTTTCATGAAGGCCTACT) y HR1 (5'TGGATAACCTACGGTGTGTT) que amplifican un fragmento de 437 pb específico de *Chlamydia pneumoniae* (Campbell *et al.*, 1992).

La reacción se programaba de la manera siguiente: 1 ciclo de 4 min a 95°C; 40 ciclos de 1,5 min a 95°C, 1,5 min a 56°C y 1,5 min a 70°C. Se finalizaba con 1 ciclo de 10 min a 70°C .

5.4. *Legionella pneumoniae*.

Los cebadores utilizados fueron los desarrollados por Starnbach *et al.* (1989): LEG-1 (5'GTCATGAGGAATCTCGCTG) y LEG-2 (5'CTGGCTTCTTCCAGCTTCA), que amplifican una banda de 0,8 kb. El perfil de temperaturas consistió en: 1 ciclo de 4 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (2 min); y 1 ciclo de 10 min a 72°C.

5.5. Infecciones bacterianas del SNC.

Para la amplificación del DNA de cualquier bacteria implicada en casos de meningitis se utilizaron los cebadores bacterianos "universales" RWO1 (5'AACTGGAGGAAGGTGGGGAT) y DG74 (5'AGGAGGTGATCCAACCGCA), que amplifican DNA ribosomal del genoma de muchas bacterias, entre ellas, las que habitualmente encontramos en el LCR como causantes de meningitis (Leong *et al.*, 1993).

La reacción se llevaba a cabo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con la mezcla de reactivos habitual. Los ciclos de temperaturas eran: 1 ciclo de 94°C (4 min), 35 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (1 min), y finalmente 1 ciclo de 72°C (10 min). La identificación del producto amplificado (Fig. 3) se realizaba mediante hibridación con sondas marcadas con biotina en el extremo 5' (Tabla 1) específicas para los microorganismos implicados en meningitis bacterianas.

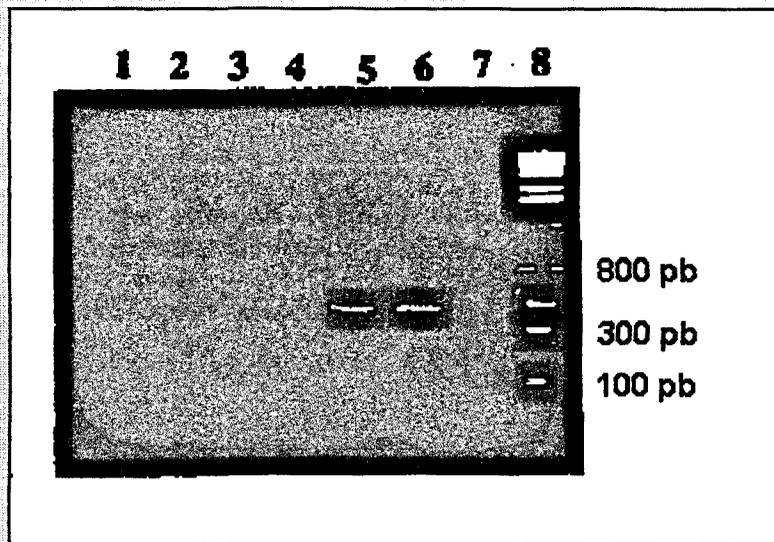


Fig. 3.- Producto amplificado por los cebadores "universales" de bacterias (370 pb). La calles 1-6 corresponden a muestras clínicas. La calle 7 contiene el control negativo y la 8 el marcador de pesos moleculares.

Tabla 1.- Sondas de hibridación marcadas con biotina para la identificación de los microorganismos implicados en meningitis bacterianas.

Microorganismo	Secuencia de nucleótidos 5' a 3'
<i>S. pneumoniae</i>	AACTGAGACTGGCTTTAAGAGATTA
<i>S. agalactiae</i>	TAATCTCTTAAAGCGAATCTCAGTT
<i>N. meningitidis</i>	AAGCCGCGAGGGCGGAGCCAATCT
<i>H. influenzae</i>	GGAGTGGGTTGTACCAGAAGTAGAT

5.6. *Mycobacterium tuberculosis*.

Se utilizaron los cebadores T4 (5'CCTGCGAGCGTAGGCCGTCGG) y T5 (5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG) descritos por Eisenach *et al.* (1990), que



amplifican un fragmento de 123 pb (Fig. 4) de la secuencia de inserción IS6110 específica para el complejo tuberculoso y que se repite 10 a 20 veces en las cepas de *M. tuberculosis*.

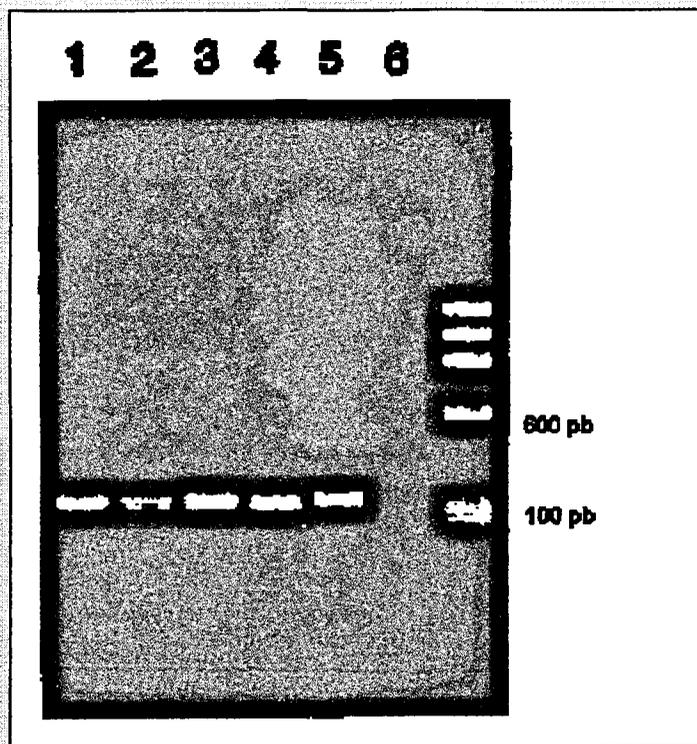


Fig 4.- Producto amplificado *M. tuberculosis* (123 pb). Las calles 1-5 contienen muestras clínicas positivas y la 6 el control negativo. La calle del extremo corresponde al marcador de pesos moleculares.

La mezcla de reactivos descrita anteriormente para la realización de la PCR fue modificada en la concentración de $MgCl_2$ (2,5 mM) para optimizar sus resultados. La programación de las temperaturas del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C (5 min); 35 ciclos de 94°C (2 min), 68°C (2 min), 72°C (2 min); y 1 ciclo de 72°C (10 min).

5.7. *Pneumocystis carinii*.

Se utilizaron los cebadores 5S-sense (5'AGTTACGGCCATACCTCAGA) y 5S-antisense (5'AAAGCTACAGCACGTCGT AT) que amplifican un fragmento de 120 pb

(Kitada *et al.*, 1991) correspondiente a la región de rDNA 5S. El perfil de temperaturas de la reacción era el siguiente: 1 ciclo de 94°C durante 4 min; 40 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72 °C (1 min); y 1 ciclo de 72°C (10 min) (Nakamura, 1993).

5.8. *Toxoplasma gondii*.

Burg *et al.* (1989) diseñaron una serie de oligonucleótidos que amplifican una secuencia del gen B1 de *T. gondii*. A partir de este trabajo se utilizó el oligo-1 (5'GGAACTGCATCCGTTTCATGAG) y el oligo-4 (5'TCTTTAAAGCGTTC GTGGTC), que amplifican un fragmento de 193 pb del gen B1. El perfil de temperaturas programadas era: 94°C (4 min); 40 ciclos de 94°C (1 min), 58°C (1 min), 72°C (1 min); y 1 ciclo de 72°C (10 min).

5.9. Citomegalovirus.

Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación del genoma de citomegalovirus fueron CMV-3 (5'AGCTGCATGATGTGAGCAAG) y CMV-4 (5'GAAGGCTGAGTTCTTGGTAA), dirigidos a las regiones conservadas del gen que codifica el antígeno inmediato-precoz (Espy *et al.*, 1993). Se utilizó la mezcla de reactivos descrita anteriormente y el perfil de temperaturas siguiente: 94°C (3 min), 60°C (1 min); 60 ciclos de 94°C (30 seg) y 60°C (30 seg). El producto amplificado corresponde a un fragmento de 147 pb.

5.10. Parvovirus B19.

Para el diagnóstico de las infecciones por Parvovirus B19 por PCR se utilizó un sistema de doble amplificación mediante los cebadores externos H (5'GGGCCGCCAAGTACAGGA) y C (5'AGGTGTGTAGAAGGCTTCTT) y los cebadores internos F (5'AATGAAAACCTTCCATTTAATGA) e I (5'TCCTGAAC TGGTCCCGGGGATGGG) (Clewley, 1993). El producto de la primera amplificación corresponde a un fragmento de 744 pb y el de la segunda a un fragmento de 591 pb (Fig. 5). En muchas ocasiones el resultado de la primera amplificación es ya visible en la detección por electroforesis, pero con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica se realizaba una segunda amplificación. Esta segunda amplificación hace ya innecesario la

utilización de técnicas de hibridación para la identificación del producto. Las rampas de temperatura programadas en el termociclador para ambas amplificaciones eran: un ciclo de 94°C (5 min); 35 ciclos de 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (1 min); y 1 ciclo de 72°C (10 min).

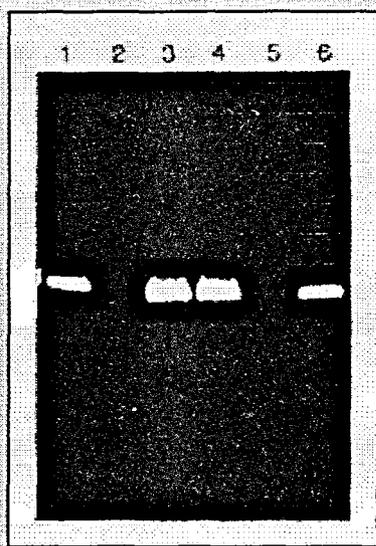


Fig 5.- Producto amplificado de Parvovirus B19 (591 pb). Las calles 1 y 6 contienen un control positivo. En la calle 2 está situado el control negativo y las calles 3-5 corresponden a muestras clínicas.

5.11. Virus JC.

Se utilizó el juego de cebadores JCV-9 (5'GCTTATTCAGAA GTAGTA) y JCV-10 (5'TATCCACACAAGTGGG) específico del virus JC, ya que la secuencia que amplifican no se encuentra en otros virus próximos como el BK o el SV40 (Aksamit, 1993). El producto amplificado corresponde a un fragmento de 503 pb. En la reacción se utilizó un perfil de tres temperaturas: 35 ciclos de 94°C (90 seg), 55°C (90 seg) y 72°C (2 min), y la mezcla de reactivos habitual.

5.12. Herpes simplex.

Se utilizaron los cebadores HSV-1 (5'CATCACCGACCCGGAGAGGGGAC) y HSV-2 (5'GGGCCAGGCGCTTGT TGGTGTA), que amplifican una secuencia del gen de la polimerasa del virus herpes simplex (Rowley *et al.*, 1990) generando un producto de 92 pb.

Los tubos de la reacción se colocaron en un termociclador programado a 2 temperaturas: 1 ciclo de 94°C (4 min) y 60°C (1 min); a continuación 60 ciclos de 94°C (30 seg) y 60°C (30 seg).

5.13. Enterovirus.

Para la PCR de enterovirus se utilizó el diseño descrito por Rotbart (1990) con cebadores "universales" que amplifican una secuencia de la región 5'NTR homóloga al 100% en los nueve enterovirus que se han secuenciado (Rotbart, 1991). Los cebadores descritos son: MD90 (5'ATTGTCACCATAAGCAGCCA) y MD91 (5'CCTCCG GCCCCTGAATGCGGCTAAT).

La transcripción inversa se realizaba en un tubo de 1,5 ml donde se colocaba 4 µl de tampón de transcripción inversa 5× (Tris-ClH 250 mM, NaCl₂ 15 mM, KCl 350 mM y ditiotreitól 50 mM), 2 µl de cada nucleósido trifosfato (10 mM), 4 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato, 40 unidades de RNAsina (Promega), 2 µl del cebador MD90 (antisentido), 20 µl de RNA extraído de la muestra y 10 unidades de transcriptasa inversa (Sigma). Se añadían 80 µl de aceite mineral y se incubaba a 42°C durante 90 min. Terminada la transcripción se incubaba el tubo a 90°C durante 5 min y a continuación se añadía 54 µl de la mezcla de reactivos 2× para la PCR, procediendo a su realización con los siguientes ciclos: 1 ciclo a 94°C (4 min); 40 ciclos a 94°C (1 min), 50°C (1 min) y 72°C (1 min); y 1 ciclo de 72°C (10 min). El producto amplificado corresponde a una banda de 154 pb.

5.14. *Leishmania*.

El fragmento objeto de amplificación está localizado en el DNA del kinetoplasto de *Leishmania* y los cebadores derivan de una región bien conservada de 200 pb cuya amplificación resulta en un producto de 120 pb. Estos cebadores, 13A (5'GGTGGGGAGGGGCGTTCT) y 13B (5'ATTTTACACCAACC CCCAGTT), fueron descritos por Rodger *et al.* (1990) y son comunes para la amplificación de las siete especies de *Leishmania*.

La mezcla de reactivos 2× previamente descrita se modificó en la concentración de MgCl₂ (2 mM) para optimizar sus resultados. Los ciclos de temperatura de la reacción eran: un ciclo de 94°C (4 min); 35 ciclos de 94°C (30 seg) y 50°C (2 min).

5.15. *Plasmodium*.

Se utilizaron unos cebadores específicos de género: 566R (5'GGATAACTACGGAAAAGCTGTAGC) Y 570R (5'CGACTTCTCCTTCCTTTA AAAGATAGG) (Mathiopoulos *et al.*, 1993), que se usaron en combinación con sondas específicas de especie (marcadas con biotina en el extremo 5') derivadas de secuencias del gen rRNA de la subunidad ribosomal pequeña de las diferentes especies (Tabla 2).

Tabla 2.- Sondas de hibridación para la identificación de las diferentes especies de *Plasmodium*.

Especie	Secuencia de nucleótidos 5' a 3'
<i>P. falciparum</i>	GAATAGAGTAAAAACAATTT
<i>P. ovale</i>	CTTAGTGTATTCTTCAAAT
<i>P. vivax</i>	CCGAATTCAGTCCCACGTAA
<i>P. malariae</i>	TTTCACTTAAGAATATAGTGTATTT

Se utilizaba la mezcla de reactivos 2× habitual en este estudio y el perfil de temperaturas siguiente: 1 ciclo a 94°C (4 min); 35 ciclos a 94°C (1 min), 56°C (1 min) y 72°C (1 min); 1 ciclo a 72°C (10 min). El tamaño del producto amplificado corresponde a un fragmento de 1,7 kb.

6. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.-

6.1. Electroforesis.

La detección del producto amplificado se realizaba mediante separación por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en tampón TBE (Tris-borato 0,045 M y EDTA 1mM) con bromuro de etidio incorporado (0,05%) y visualización en un transiluminador de luz ultravioleta. Las muestras se corrían durante 30-40 min a intensidad constante (20-30 mA). El tamaño de la banda se cuantificaba en base a su comparación con la movilidad de las bandas de una serie de marcadores de pesos moleculares (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL) consistente en 15 fragmentos entre 100 y 1500 pb a intervalos de 100 y un fragmento adicional de 2027 pb.

6.2. Hibridación con sondas específicas.

La técnica de hibridación sirvió, a la vez, como técnica de detección (sobre todo en aquellos casos en los que la electroforesis aportaba resultados negativos o poco concluyentes) y como técnica de identificación del producto amplificado, confiriendo al resultado un elevado grado de especificidad. Para ello se utilizó una técnica comercializada (Gen-Eti-K DEIA, Sorin Biomedica) basada en un sistema de enzimoanálisis que permite el aprovechamiento de parte de la infraestructura del laboratorio de Microbiología.

El principio de la técnica se basa en la hibridación del DNA amplificado con una sonda específica adherida a la pared de los pocillos de una placa de microtitulación mediante unión estreptavidina-biotina. El híbrido de la sonda y el DNA que se pretende examinar se detecta mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-DNA. Este

anticuerpo reacciona solamente con la doble cadena de DNA y no con la cadena sencilla. Una vez dispensadas las muestras del DNA desnaturalizado en los pocillos de la placa, la sonda se une específicamente con la cadena complementaria para formar un híbrido. Después de la incubación de la muestra y subsiguiente lavado de la placa se añade el anticuerpo frente a la doble cadena de DNA, identificando los pocillos donde ha tenido lugar la hibridación. La adición final de un anticuerpo anti IgG marcado con peroxidasa detecta el complejo anticuerpo-DNA mediante una reacción colorimétrica. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

7. CONTROL DE CALIDAD.-

En todas las reacciones de PCR se procesaba paralelamente: i) un control positivo obtenido de cepas del propio laboratorio o de la ATTC u otras casas comerciales (Tabla 3), ii) un control negativo consistente en 50 µl de agua destilada y iii) un control de amplificación para detectar posibles inhibidores de la Taq polimerasa presentes en la muestra a estudiar. Este último control se preparaba en un tubo aparte con 40 µl de la muestra a estudiar y 10 µl del control positivo. Las condiciones de amplificación de estos controles eran las mismas que las de las muestras problema.

8. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS CONVENCIONALES.-

Las muestras obtenidas para la detección e identificación de bacterias cultivables por los métodos habituales se sembraban en medios de agar sangre, agar chocolate, Mc Conkey y caldo tioglicolato. En aquellos casos en que fue indicado se realizaron también cultivos específicos para aislamiento de *Legionella* o cultivos para micobacterias siguiendo las pautas convencionales de diagnóstico microbiológico (Murray *et al.*, 1995).

Así mismo, se practicaba un estudio serológico en todos aquellos pacientes con sospecha de infección por microorganismos para los cuales existen técnicas serológicas evaluadas y disponibles (Tabla 4). Las técnicas empleadas en cada caso se ajustaban a las indicaciones de la casa comercial. En la mayor parte de pacientes se obtenían dos

muestras de suero separadas por un intervalo de tiempo de 4-5 semanas y se procesaban en paralelo. La interpretación de los resultados serológicos se ajustó estrictamente a los criterios descritos habitualmente (Murray *et al.*, 1995).

Tabla 3.- Cepas de microorganismos utilizadas como control positivo en las reacciones de amplificación.

Microorganismo	Cepa control
<i>M. pneumoniae</i>	ATCC 15531 (FH)
<i>Ch. pneumoniae</i>	ATCC 53592 (AR-39)
<i>L. pneumoniae</i>	ATCC 33156 (Philadelphia)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasma-Spot (BioMerieux)
<i>Plasmodium</i>	Falciparum-Spot (BioMerieux)
Enterovirus	Suspensión Coxackie y Echo (Behring)
<i>Leishmania</i>	Leishmania-Spot (BioMerieux)

Tabla 4.- Técnicas serológicas realizadas en el estudio rutinario de los diferentes gérmenes.

Microorganismo	Técnica	Referencia comercial
<i>M. pneumoniae</i>	Inmunofluorescencia	Vircell S.L.
<i>C. pneumoniae</i>	Microinmunofluorescencia	Vircell S.L.
<i>L pneumophila</i>	Inmunofluorescencia	Vircell S.L.
<i>Toxoplasma</i>	Enzimoinmunoanálisis	Diagnostic Grifols S.A.
Cytomegalovirus	Enzimoinmunoanálisis	Diagnostic Grifols S.A.
Parvovirus B19	Inmunofluorescencia	Biotrin International
<i>Leishmania</i>	Hemaglutinación indirecta	Cellognost Behring
Herpes simplex	Enzimoinmunoanálisis	Diagnostic Grifols S.A.
Enterovirus	Fijación del complemento	Behring

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

La eficacia diagnóstica de la PCR se analizó en base a los criterios clásicos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo utilizando para su análisis el paquete estadístico Microstat (Ecosoft Inc). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

D) RESULTADOS

1. EVALUACION DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA.-

Para la extracción del DNA de las muestras clínicas se utilizaron en este estudio dos métodos: la extracción clásica con fenol-cloroformo llevada a cabo aproximadamente durante la primera mitad del estudio y la extracción con los métodos rápidos descritos en los apartados 3.2 y 3.3 de Materiales y Métodos, utilizada en la segunda fase del estudio.

1.1. Extracción con fenol-cloroformo.

Los estudios mediante muestras clínicas inoculadas experimentalmente con diluciones seriadas de los microorganismos sometidos a estudio dieron una sensibilidad para la PCR, cuando se purificaba el DNA por el método del fenol-cloroformo, de 25 UFC para *M. tuberculosis* y alrededor de 10 UFC para aquellos microorganismos (neumococo y meningococo) probados con cultivos convencionales (Tablas 5 y 6). El grado de pureza del DNA obtenido se determinó en base a la frecuencia de aparición de fenómenos de inhibición de la polimerasa que, mediante este método, fue alrededor del 3% de las muestras procesadas (13 de 439 muestras). El tiempo medio empleado para la realización de este método está situado en 3-4 horas.

Tabla 5.- Sensibilidad de la PCR frente a *M. tuberculosis* sobre muestras de esputo, utilizando DNA extraído por el método del fenol-cloroformo, comparada con métodos microbiológicos convencionales de cultivo.

Dilución	PCR	Lowenstein (N° colonias)
1	+	+(incontables)
2	+	+(>100)
3	+	+(25)
4	-	+(8)

Diluciones: a partir de una suspensión bacteriana inicial se realizaban diluciones seriadas al 1/100 en un volumen total de 1 ml. De cada dilución se separaron 200 µl para las PCR y 200 µl para el cultivo convencional en medio de Lowenstein.

Tabla 6.- Sensibilidad de la PCR frente a neumococo y meningococo en muestras obtenidas por PTA, utilizando DNA extraído por el método del fenol-cloroformo, comparada con métodos microbiológicos convencionales de cultivo

Dilución	PCR	Cultivo (N° colonias)
1	+	+(incontables)
2	+	+(>500)
3	+	+(100)
4	+	+(10)
5	-	+(3)

Diluciones: a partir de una suspensión bacteriana inicial se realizaban diluciones seriadas al 1/100 en un volumen total de 1 ml. De cada dilución se separaron 200 µl para las PCR y 200 µl para el cultivo convencional.

1.2. Extracción con métodos rápidos.

Se empleó el método rápido de extracción descrito en el apartado 3.3 de Materiales y Métodos. La sensibilidad de la PCR, en nuestras manos, mediante este método y en estudios experimentales idénticos a los anteriores fue de alrededor de 50 UFC para *M. tuberculosis* y 21 UFC (Tablas 7 y 8) para los otros microorganismos estudiados (neumococo y meningococo). El número de inhibiciones fue inferior al 1% (7 de 837 muestras procesadas), y el tiempo que conlleva la aplicación de este método oscila entre 20-30 minutos.

Tabla 7.- Sensibilidad de la PCR frente a *M. tuberculosis* en muestras de esputo, utilizando DNA obtenido por métodos rápidos de extracción, comparada con métodos microbiológicos convencionales de cultivo.

Dilución	PCR	Lowenstein (N° colonias)
1	+	+ (incontables)
2	+	+ (>300)
3	+	+ (50)
4	-	+ (12)

Diluciones: a partir de una suspensión bacteriana inicial se realizaban diluciones seriadas al 1/100 en un volumen total de 1 ml. De cada dilución se separaron 200 µl para las PCR y 200 µl para el cultivo convencional en medio de Lowenstein.

Tabla 8.- Sensibilidad de la PCR frente a neumococo y meningococo en muestras obtenidas por PTA, utilizando DNA obtenido por métodos rápidos de extracción, comparada con métodos microbiológicos convencionales de cultivo.

Dilución	PCR	Cultivo (N° colonias)
1	+	+ (incontables)
2	+	+ (>200)
3	+	+ (21)
4	-	+ (5)

Diluciones: a partir de una suspensión bacteriana inicial se realizaban diluciones seriadas al 1/100 en un volumen total de 1 ml. De cada dilución se separaron 200 µl para las PCR y 200 µl para el cultivo convencional.

2. LA PCR EN LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS.-

Se incluyeron en este grupo los pacientes con infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad, aplicándose para su diagnóstico, además de los métodos convencionales, técnicas de amplificación de genoma frente a neumococo, micoplasma y clamidia.

2.1. *Streptococcus pneumoniae*.

Se procesaron 114 muestras procedentes de otros tantos pacientes. Los tipos de muestras objeto de estudio fueron: 101 secreciones pulmonares obtenidas por punción transtorácica aspirativa (PTA), 4 líquidos pleurales, 6 esputos y 3 aspirados bronquiales. La PCR ofreció resultados positivos en 20 casos (17 PTA y 3 esputos) mientras que el cultivo convencional ofreció resultados positivos en 9 casos (8 PTA y 1 esputo) (Tabla 9).

Tabla 9.- Resultados de la PCR y el cultivo en la detección de neumococo sobre diferentes muestras

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Cultivo +	Cultivo -
PTA	101	17	84	8	93
Pleural	4	0	4	0	4
Esputo	6	3	3	1	5
BAS	3	0	3	0	3

En todos los casos en que el cultivo fue positivo para neumococo la PCR sobre la misma muestra detectó también el microorganismo. Si comparamos los dos métodos la PCR ofrece un 55% más de resultados positivos que el cultivo convencional.

De los 114 pacientes estudiados, 30 de ellos fueron diagnosticados definitivamente como afectados de infección neumocócica en base a los datos microbiológicos anteriores y los datos aportados a partir de otras muestras (hemocultivos) y otras técnicas (detección de antígeno), confirmados, además, por la ausencia de otros microorganismos bacterianos o víricos y la evolución clínica y respuesta al tratamiento. Partiendo de estos datos, concluimos que la PCR nos da una sensibilidad clínica del 66,6%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y predictivo negativo del 89% (Tablas 10 y 11 y Fig. 6). Frente a ello, el cultivo convencional ofrece una sensibilidad del 30%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y predictivo negativo del 80%.

Tabla 10.- Resultados de la PCR en relación con la presencia o no de infección neumocócica.

	Infección	No infección	Total
PCR +	20	0	20
PCR -	10	84	94
Total	30	84	114

Tabla 11.- Resultados del cultivo en relación con la presencia o no de infección neumocócica.

	Infección	No infección	Total
Cultivo +	9	0	9
Cultivo -	21	84	105
Total	30	84	114

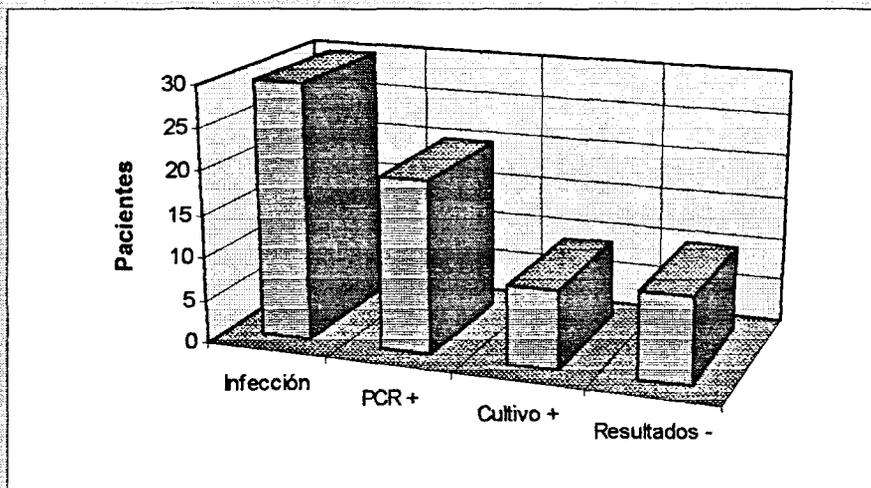


Fig. 6.- Resultados de la PCR y el cultivo en 30 pacientes con infección neumocócica. La barra de la derecha indica los pacientes con infección que dieron negativa la PCR.

2.2. Infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*.

Se procesaron por PCR frente a *M. pneumoniae* 94 muestras: 83 PTA, 1 líquido pleural, 6 esputos y 4 broncoaspirados. A 87 de estos 94 pacientes se les practicó estudio serológico frente a *M. pneumoniae*.

La PCR dio resultados positivos en 9 casos (9 muestras obtenidas por PTA) y negativos en el resto de pacientes. El estudio serológico practicado en paralelo sobre dos muestras de suero separadas por un intervalo de tiempo de 4-5 semanas detectó infección por micoplasma en 20 pacientes (Tabla 12).

Tabla 12.- Resultados de la PCR y la serología en las infecciones por *Mycoplasma*.

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Serología +	Serología -
PTA	83	9	74	20	63
Espuito	6	0	6	NR	NR
BAS	4	0	4	0	4
Pleural	1	0	1	NR	NR

NR: Prueba no realizada

La sensibilidad de la PCR en el diagnóstico clínico de la infección respiratoria tomando como referencia el diagnóstico obtenido por serología fue del 45%, con una especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 87% (Tabla 13 y Fig. 7).

Tabla 13.- Resultados de la PCR en relación con la presencia o no de infección por *Mycoplasma*

	Infección	No infección	Total
PCR +	9	0	9
PCR -	11	67	78
Total	20	67	87

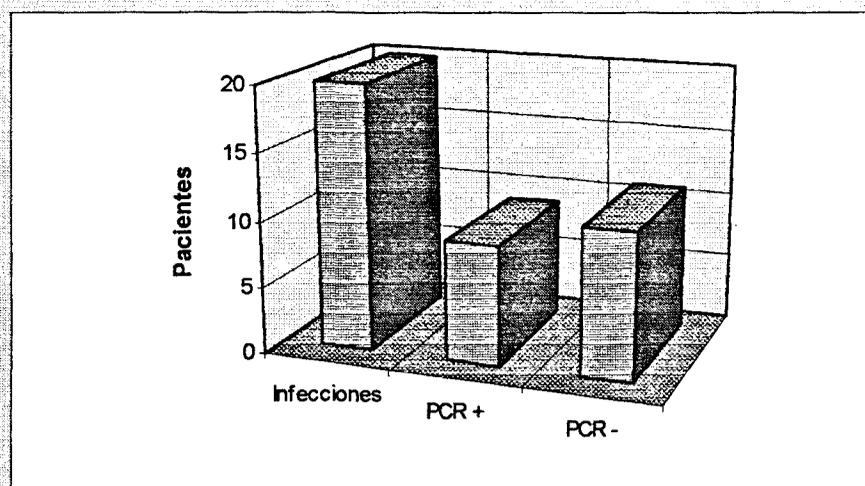


Fig. 7.- Resultados de la PCR en 20 pacientes con infección por *M. pneumoniae*

2.3. *Chlamydia pneumoniae*.

Se estudiaron por PCR 100 muestras: 84 PTA, 8 esputos, 4 broncoaspirados, 2 biopsias pulmonares, 1 líquido pleural y 1 frotis faríngeo. Se practicó estudio serológico en 89 pacientes, aportando el diagnóstico de infección por *C. pneumoniae* en 14 casos. La PCR fue positiva en 8 de estos casos (todos ellos con muestra obtenida por PTA) y negativa en el resto (Tabla 14).

Con referencia al diagnóstico serológico la PCR dio una sensibilidad clínica del 57%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 92% (Tabla 15 y Fig 8).

Tabla 14.- Resultados de la PCR y la serología en infecciones por *Chlamydia pneumoniae*.

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Serología +	Serología -
PTA	84	8	76	14	70
Espuito	8	0	8	NR	NR
BAS	4	0	4	0	4
Biopsia	2	0	2	NR	NR
Pleural	1	0	1	0	1
Faríngeo	1	0	1	NR	NR

NR: Prueba no realizada

Tabla 15.- Resultados de la PCR en relación con la presencia o no de infección por *Chlamydia pneumoniae*.

	Infección	No infección	Total
PCR +	8	0	8
PCR -	6	86	92
Total	14	86	100

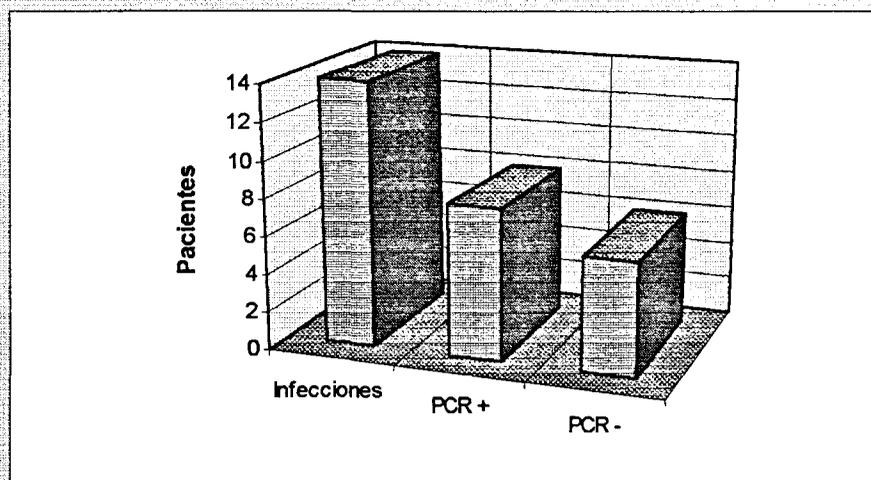


Fig. 8.- Resultados de la PCR en 14 pacientes con infección por *C. pneumoniae*

2.4. *Legionella pneumophila*.

Se estudiaron 59 muestras por PCR: 30 esputos, 4 PTA, 7 líquidos pleurales y 18 broncoaspirados. Solamente se incluyeron en el estudio aquellos pacientes en que expresamente se solicitó por el clínico descartar la presencia de *Legionella*. Tres esputos fueron positivos por PCR. El cultivo frente a *Legionella* fue negativo en los tres casos (Tabla 16). La serología sobre una única muestra de suero fue también negativa. En otros 5 casos de infección por *Legionella* diagnosticados por serología no se practicó la PCR. El pequeño número de casos no permite hacer una valoración estadística.

Tabla 16.- Resultados de la PCR y el cultivo en las infecciones por *Legionella pneumophila*.

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Cultivo +	Cultivo -
Espuito	30	3	27	0	30
BAS	18	0	18	0	18
Pleural	7	0	7	0	7
PTA	4	0	4	0	4

3. LA PCR EN LAS INFECCIONES POR *M. tuberculosis*.-

Se procesaron paralelamente por PCR y cultivo en medio de Lowenstein 310 muestras: 170 esputos, 20 PTA, 13 líquidos pleurales, 30 LCR, 44 aspirados gástricos, 21 aspirados medulares, 6 orinas y 6 exudados purulentos. Los resultados obtenidos en combinación con las dos técnicas permitieron hacer el diagnóstico en 70 casos. De ellos, la PCR detectó 63 y el cultivo 56. De los 70 casos, 7 fueron positivos por cultivo y negativos por PCR (4 esputos, 1 PTA, 1 LCR y 1 exudado), en tanto que 8 casos fueron positivos por PCR y negativos por cultivo (4 aspirados gástricos, 1 PTA, 2 aspirados medulares, 1 orina. (Tabla 17). Se consideraron pacientes con infección tuberculosa aquellos en los cuales una u otra técnica ofreció resultados positivos y que además fueron diagnosticados clínicamente como pacientes tuberculosos y tratados con tuberculostáticos durante al menos tres meses.

Tabla 17.- Resultados de la PCR y el cultivo en la detección de *M. tuberculosis*.

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Cultivo +	Cultivo -
Respiratoria	170	37	133	39	131
LCR	30	2	28	2	28
Gástrica	44	9	35	5	39
PTA	20	5	15	4	16
Pleural	13	1	12	1	12
Médula	21	2	19	0	21
Orina	6	2	4	1	5
Exudado	6	5	1	4	2

La sensibilidad de la PCR fue del 90%, con una especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 97% (Tablas 18 y 19 y Fig. 9). Frente a ella el cultivo ofreció una sensibilidad del 80%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 94%.

Tabla 18.- Resultados de la PCR en relación con la presencia o no de infección tuberculosa

	Infección	No infección	Total
PCR +	63	0	63
PCR -	7	240	247
Total	70	240	310

Tabla 19.- Resultados del cultivo en relación con la presencia o no de infección tuberculosa.

	Infección	No infección	Total
Cultivo +	56	0	56
Cultivo -	14	240	254
Total	70	240	310

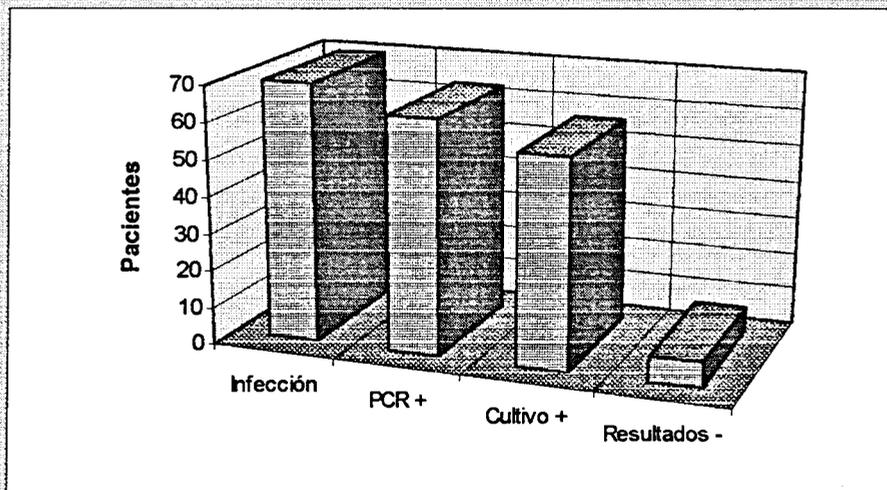


Fig. 9.- Resultados de la PCR y el cultivo en 70 pacientes con infección tuberculosa. La barra de la derecha indica los pacientes con infección que dieron negativa la PCR.

4. LA PCR EN LAS INFECCIONES BACTERIANAS DEL SNC.-

Se realizó la PCR y el cultivo convencional sobre 48 muestras de LCR procedentes de pacientes con sospecha clínica de meningitis bacteriana. La PCR fue positiva en 41 casos, detectándose los siguientes microorganismos: 31 *N. meningitidis*, 7 *S. pneumoniae*, 2 *H. influenzae* y 1 *S. agalactiae*. El cultivo dio resultados positivos en 30 casos: 24 *N. meningitidis*, 2 *H. influenzae*, 3 *S. pneumoniae* y 1 *S. agalactiae*. En 7 pacientes con sospecha clínica de meningitis bacteriana no se detectó germen alguno ni por PCR ni por cultivo (Tabla 20).

La sensibilidad de la PCR en pacientes con diagnóstico clínico de meningitis bacteriana, con una prevalencia asumida de la enfermedad en este grupo de población del 95%, fue del 91%, con una especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 74% (Tabla 21 y Fig. 10).

Tabla 20.- Microorganismos detectados por PCR y cultivo en 48 muestras de LCR.

Microorganismo	Resultados positivos por	
	PCR (%)	Cultivo (%)
<i>N. meningitidis</i>	31 (64.5)	24 (50)
<i>S. pneumoniae</i>	7 (14.5)	3 (6.2)
<i>H. influenzae</i>	2 (4.1)	2 (4.1)
<i>S. agalactiae</i>	1 (2)	1 (2)
Resultado negativo	7 (14.5)	18 (37.5)



Tabla 21.- Comparación de los resultados de la PCR y el cultivo en el diagnóstico de meningitis bacterianas

	PCR +	PCR -	Total
Cultivo +	30	0	30
Cultivo -	11	7	18
Total	41	7	48

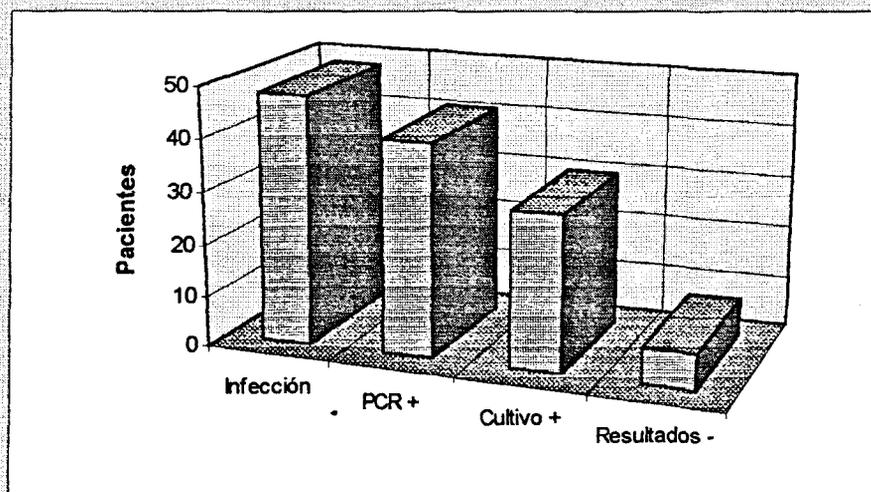


Fig. 10.- Resultados de la PCR y el cultivo en 48 pacientes con meningitis bacteriana. La barra de la derecha indica los pacientes con infección que dieron negativa la PCR.

5. LA PCR EN LAS INFECCIONES EN INMUNODEPRIMIDOS.-

5.1. Infecciones por *P. carinii*.

Se estudiaron 375 muestras para detección de *P. carinii*: 284 esputos, 50 PTAs y 41 BAS, con los siguientes resultados: 65 muestras positivas por PCR (46 esputos, 13 PTAs y 6 BAS) y el resto negativos (Tabla 22).

Tabla 22.- Resultados de la PCR en la detección de *Pneumocystis carinii*.

Muestra	Número	PCR +	PCR -
Esputo	284	46	238
PTA	50	13	37
BAS	41	6	35

En 29 pacientes en que se realizó la tinción con MTP en paralelo con la PCR, aquella fue positiva en 12 casos (41%) y la PCR en 20 (68%). Tres de estos casos fueron positivos sólo por tinción y 10 positivos sólo por PCR, mostrándose ésta más sensible que la tinción en la detección de *P. carinii* sobre cualquier muestra clínica (Tabla 23 y Fig. 11).

Tabla 23.- Comparación de los resultados de la PCR y la MTP en 29 pacientes.

	PCR +	PCR -	Total
MTP +	9	3	12
MTP -	11	6	17
Total	20	9	29

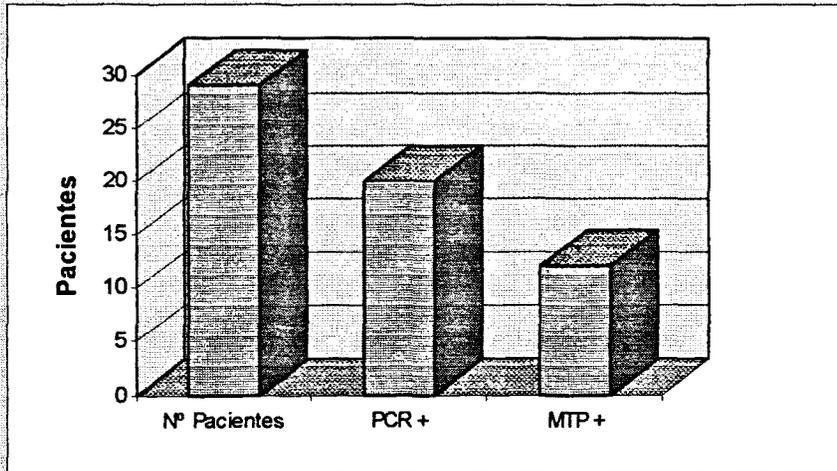


Fig. 11.- Comparación entre la PCR y la MTP en la detección de *P. carinii*

5.2. Infecciones por *Toxoplasma gondii*.

Se estudiaron 51 pacientes con sospecha clínica o enfermedad compatible con infección por *Toxoplasma*. La PCR dio resultados positivos sobre 7 muestras: 2 LCR, 3 muestras de sangre, 1 orina y 1 PTA. (Tabla 24). En dos de estos pacientes se realizó estudio serológico con resultados negativos, mientras que en el resto no se practicó. En tres pacientes con diagnóstico clínico de toxoplasmosis cerebral la PCR fue negativa, obteniendo una sensibilidad del 40% en el diagnóstico de este cuadro clínico.

Tabla 24.- Resultados de la PCR en la detección de *Toxoplasma gondii*.

Muestras	Número	PCR +	PCR -
LCR	14	2	12
Orina	14	1	13
Sangre	16	3	13
Espuito	5	0	5
PTA	2	1	1

5.3. Infecciones por Citomegalovirus.

Se estudiaron por PCR 226 muestras: 50 orinas, 24 esputos, 117 muestras de sangre, 13 PTAs, 9 LCRs y 13 biopsias, resultando positivas 37 de ellas (23 muestras de sangre, 2 PTAs, 4 orinas, 5 esputos, 2 biopsias y 1 LCR) (Tabla 25). Las muestras de sangre para estudio de citomegalovirus correspondían a pacientes inmunodeprimidos sin clínica de infección con el objeto de determinar aquellos pacientes portadores del virus.

Tabla 25.- Resultados de la PCR en la detección de citomegalovirus

Muestras	Número	PCR +	PCR -
Sangre	117	23	94
Orina	50	4	46
Esputo	24	5	19
PTA	13	2	11
Biopsia	13	2	11
LCR	9	1	8

6. LA PCR EN LA DETECCIÓN DE OTROS AGENTES INFECCIOSOS.-

6.1. Parvovirus B19.

Se estudiaron un total de 11 muestras (7 de sangre periférica y 4 aspirados medulares). Dos muestras de sangre y un aspirado medular fueron positivos por PCR. La serología dio resultados negativos en los tres pacientes (Tabla 26).

Tabla 26.- Resultados de la PCR y la serología en las infecciones por Parvovirus B19.

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Serología +	Serología -
Sangre	7	2	5	0	7
Médula	4	1	3	0	4

6.2. Virus JC.

Cuatro LCRs de pacientes con síntomas de encefalopatía fueron estudiados por PCR con resultado positivo en uno de ellos, confirmado posteriormente por técnicas inmunohistoquímicas sobre biopsia cerebral.

6.3. Herpes simplex.

Se procesaron 62 muestras clínicas: 29 frotis sobre úlceras genitales, 25 LCRs, 6 frotis bucales y 2 orinas. La PCR fue positiva en 24 casos (13 exudados genitales, 9 LCR, 1 frotis bucal y 1 orina). La serología fue positiva en 2 de los 9 pacientes con infección del SNC, determinada por el carácter positivo de la PCR, negativa en uno y no se practicó en el resto (Tabla 27).

Tabla 27.- Resultados de la PCR en la detección de herpes simplex

Muestras	Número	PCR +	PCR -
Frotis genital	29	13	16
LCR	25	9	16
Frotis bucal	6	1	5
Orina	2	1	1

6.4. Enterovirus.

Se estudiaron 96 muestras (40 LCRs, 28 frotis faríngeos y 28 muestras de heces) procedentes de 40 pacientes pediátricos con sospecha de infección por enterovirus. De ellas, 25 muestras de 16 pacientes dieron resultados positivos por PCR: 2 LCRs, 12 frotis faríngeos y 11 muestras de heces (Tabla 28). De estos 16 pacientes la serología fue positiva en uno de ellos, negativa en otros dos y no se practicó en el resto.

Tabla 28.- Resultados de la PCR en la detección de Enterovirus.

Muestras	Número	PCR +	PCR -
LCR	40	2	38
Faríngeo	28	12	16
Heces	28	11	17

6.5. *Leishmania*.

Se procesaron 6 muestras procedentes de pacientes inmunodeprimidos con un cuadro de fiebre de origen desconocido (2 muestras de sangre periférica y 4 aspirados medulares). Un aspirado medular fue positivo frente a *Leishmania* (Tabla 29), en tanto que la serología frente al mismo fue negativa.

Tabla 29.- Resultados de la PCR y la serología en la detección de *Leishmania*.

Muestra	Número	PCR +	PCR -	Serología +	Serología -
Sangre	2	0	2	0	2
Médula	4	1	3	0	4

6.6. *Plasmodium*.

Se estudiaron 12 muestras de sangre para el diagnóstico de paludismo, siendo positivas 5 de ellas (correspondiendo 2 a *P. falciparum* y 3 a *P. vivax*). El estudio de las extensiones de sangre en porta día también resultó positivo en los 5 casos. Otros 4 pacientes fueron negativos por las dos técnicas y 3 pacientes fueron estudiados sólo por PCR con resultados negativos.