

5. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Olga María Diz Mellado

Graduada en Farmacia

Residente en formación, especialidad Análisis Clínicos

Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz

Fecha recepción: 21.07.2020

Fecha aceptación: 27.08.2020

RESUMEN

La microbiología ha sido durante muchos años una disciplina muy manual, basada en cultivos, realización de pruebas bioquímicas o en la observación de características físicas y de tinción. El diagnóstico de las enfermedades infecciosas ha ido cambiando de forma muy notable en los últimos años debido a los avances en técnicas de diagnóstico, basados en la biología molecular. Estas técnicas permiten establecer el diagnóstico de forma mucho más precoz y fiable, a la vez que permiten la monitorización de la enfermedad, establecer su pronóstico y aumentar la supervivencia. Entre las técnicas de biología molecular, existen muchas variantes para amplificar, detectar y secuenciar los ácidos nucleicos (ADN o ARN en función de la sospecha clínica). La técnica más básica es la reacción en cadena de la polimerasa y sobre esta se han ido desarrollando diferentes modificaciones para mejorar el proceso de diagnóstico e interpretación, entre ellas, la PCR en tiempo real o cuantitativa, la RT-PCR, los microarrays y la secuenciación. A lo largo del trabajo, se detallan diferentes técnicas que permiten el análisis de diferentes muestras para uno o múltiples microorganismos (mediante la utilización de paneles).

Palabras clave: Diagnóstico, biología molecular, microorganismo, identificación.

ABSTRACT

Microbiology has been for many years a very manual discipline, based on cultures, performing biochemical tests, or observing physical and staining characteristics. The diagnosis of infectious diseases has changed dramatically in recent years due to advances in diagnostic techniques based on molecular biology. These techniques make it possible to establish the early and reliable diagnosis, while allowing the monitoring of the disease, establishing its prognosis and increasing survival. Among molecular biology techniques, there are many variants to amplify, detect and sequence nucleic acids (DNA or RNA based on clinical suspicion). The basic technique is the polymerase chain reaction and different modifications have been developed on this

to improve the diagnostic and interpretation process, including real-time PCR or quantitative PCR, RT-PCR, microarrays and sequencing. Different techniques that allow the analysis of different samples for one or multiple microorganisms (through the use of panels) are detailed in this work.

Keywords: *Diagnosis, molecular biology, microorganism, identification.*

1. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA E INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Tradicionalmente la microbiología ha sido una disciplina muy manual. Algunas de las razones son la gran diversidad de tipos de muestras que se reciben en el laboratorio de microbiología, el número de microorganismos existentes y el volumen de muestras (mucho menor que un examen bioquímico o hematológico).

Con los grandes avances en los últimos años la microbiología clínica ha cambiado rápidamente. La identificación de microorganismos hasta hace relativamente poco tiempo dependía de un cultivo, la realización de pruebas bioquímicas y la observación de características físicas (morfología de las colonias) y de tinción (tinción de Gram, Ziehl-Neelsen, tinta china...). Posteriormente surgió la espectrometría de masas y esta se aplicó a la identificación de microorganismos (MALDI-TOF). Esta tecnología permite la identificación de bacterias y hongos en minutos, es económica y fiable en la mayoría de los microorganismos¹.

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en sangre, y se confirma tras el hallazgo de estas en los hemocultivos. Según las características clínicas del paciente, se puede establecer un origen de la infección que haya provocado la diseminación de las bacterias a la sangre. La fungemia se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre, uno de los más frecuentes son las levaduras del género *Candida spp.*, cuya aparición es muy frecuente a partir de infecciones de catéteres. Por otro lado, la viremia se define como la presencia de virus en la sangre².

La microbiología clínica es una ciencia basada en la identificación del agente etiológico de una infección y el establecimiento de un tratamiento correcto contra el o los agentes patógenos. Es importante la relación entre el clínico y el laboratorio, por un lado el clínico debe confiar en los resultados obtenidos en el laboratorio y el laboratorio debe garantizar la entrega de resultados exactos y clínicamente importantes lo antes posible.

La identificación precoz de los microorganismos causantes disminuye de forma importante la mortalidad asociada a estos procesos, que puede variar entre un 10% y un 30% según el tipo de paciente, el origen de la infección, el manejo del paciente durante la infección y la rapidez de la identificación e instauración de un tratamiento. La instauración del tratamiento correcto es difícil y dependerá de los síntomas clínicos del paciente y la epidemiología local para conocer posibles resistencias a antibióticos (microorganismos multirresistentes)².

El diagnóstico es una etapa crítica en el manejo de los pacientes. La dificultad de detectar muchos patógenos mediante la microbiología clásica ha hecho que se desarrollen nuevos métodos diagnósticos. La microbiología clásica está asociada a inconvenientes como largos periodos de crecimiento, condiciones muy especiales de cultivo, muestras mal recogidas que complican la interpretación de los resultados o incluso imposibilitan la obtención de un resultado³. Todo esto, ha dado paso a nuevos métodos de diagnóstico, entre ellos los basados en biología molecular, que han avanzado mucho en la última década, dando lugar a técnicas muy sensibles y específicas, capaces de detectar y cuantificar pequeñas cantidades de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y proteínas de microorganismos que pueden aislarse de un cultivo o no ser cultivables *in vitro*.

El laboratorio de biología molecular es el área diagnóstica de mayor dinamismo y crecimiento en los laboratorios clínicos. Estas técnicas así como la automatización, la nanotecnología y la informática han permitido mejorar el diagnóstico de enfermedades infecciosas y con ello, la instauración temprana de un tratamiento que permita disminuir la morbimortalidad asociada a estas infecciones. Además, han permitido mejoras en la prevención de estas infecciones, por lo que las ventajas son muy importantes⁴.

Una prueba diagnóstica ideal debería ser capaz de procesar un pequeño volumen de muestra, ser rápida, técnicamente simple o automatizada, de bajo costo y que no requiriese procesamiento por lotes, es decir, que no sea necesario esperar a reunir varias muestras para su procesamiento. Esto último provocaría retrasos en la entrega de resultados⁵.

El aumento de la tasa de infecciones graves causadas por bacterias resistentes a antibióticos ha sido otra de las causas por las que se han intentado encontrar nuevas tecnologías que permitan establecer de forma más rápida los tratamientos y disminuir los errores asociados a tratamientos empíricos⁵. Los avances en estas técnicas también han hecho que aumenten los conocimientos sobre la resistencia bacteriana a antibióticos.

Por otro lado, la biología molecular ha permitido tipificar, entendiendo por esto el identificar y caracterizar microorganismos patógenos causantes de brotes infecciosos, la fuente de infección y el patrón de diseminación. La secuenciación de genomas completos de bacterias, virus o patógenos fúngicos se está empleando para la detección de patógenos concretos en brotes epidemiológicos⁴.

En cuanto a estas técnicas, existen muchas variantes para amplificar, detectar y secuenciar los ácidos nucleicos. La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica posteriormente se acompaña de la detección de la amplificación mediante gel de agarosa con un intercalante inespecífico fluorescente. La PCR en tiempo real se acompaña de la identificación inmediata de la amplificación a través de hibridación con sondas marcadas con un fluorocromo y la medida de la fluorescencia emitida por la sonda. La ventaja de esta técnica es que es rápida y se obtienen resultados en un tiempo de 30 minutos a dos horas.

La secuenciación de los productos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite identi-

ficar bacterias y otros microorganismos comparándolos con secuencias ya conocidas y que están incluidas en múltiples bases de datos. La secuenciación de ARN ribosomal 16S permite detectar e identificar microorganismos no cultivables o que presentan complicaciones en su crecimiento o cultivo. El ARN ribosomal 16S es muy específico de cada bacteria y esto hace que sea una buena diana para la identificación del microorganismo⁶.

La introducción en la práctica diaria de nuevas tecnologías tiene ventajas entre las que destacan mejores cifras de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, mayor rapidez en la obtención de resultados, mayor automatización y por tanto, capacidad para asumir una mayor carga de trabajo y mejor gestión de la actividad en el laboratorio. En cuanto a las desventajas asociadas, los analizadores e instrumentos necesarios para esta nueva forma de trabajo son equipos muy costosos, que supondrán una gran inversión inicial para el laboratorio (muchos de ellos no se lo podrán permitir). A pesar de todo, se han realizado diversos análisis de costo-efectividad que hacen que esta desventaja sea mínima comparada con las ventajas asociadas a esta tecnología⁴.

A la hora de la realización de las técnicas pueden tener diferentes enfoques, pueden ir dirigidas a un único agente patógeno o pueden ir orientadas a varios patógenos a la vez, o incluso a la identificación de posibles patógenos causantes de una patología concreta. Por ejemplo, podemos encontrar sistemas orientados únicamente a la detección de *Clostridium difficile* o paneles de patógenos bacterianos, parásitos o virus causantes de patología gastrointestinal o respiratoria, entre otras⁴. Hay que tener en cuenta cuando se trabaja con paneles de microorganismos, que aunque el resultado sea negativo no se puede excluir la infección, por lo que los estudios de identificación deben continuar.

La utilización de paneles para la identificación del microorganismo causante presenta diferentes ventajas e inconvenientes. Por un lado, destaca la rapidez con la que se obtienen los resultados (y la precoz instauración del tratamiento), la realización de estudios epidemiológicos y la identificación de brotes. Pero por el otro, destaca el alto coste asociado a la realización de estas pruebas, la realización de un panel dirigido a población general y no individualizado, la posible detección de portadores y no pacientes enfermos, posibilidad de obtención resultados falsos positivos y la necesidad en muchos casos de realizar pruebas tradicionales de forma paralela⁷.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos y para detectar, e identificar tanto microorganismos, como diferentes genotipos dentro de una misma especie y genes de resistencia al tratamiento farmacológico. Todas estas técnicas necesitan un paso previo de extracción de ADN o ARN. Una vez extraído debe purificarse de forma adecuada para evitar la presencia en la muestra de inhibidores o sustancias que contaminen y que impidan la correcta realización de la técnica posterior.

La extracción del ADN es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular. Se suelen utili-



Figura 1. Productos necesarios para la realización de la PCR. Fuente: elaboración propia.

zar kits comercializados que incluyen el protocolo específico para la extracción⁸. Los métodos de extracción de ADN se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los demás restos celulares. Pueden ser de diferentes tipos: rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica), por tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles) o por digestión enzimática (proteínasa K)⁹.

Con los avances en la biología molecular se han desarrollado múltiples equipos que realizan la extracción de ADN de la muestra de forma totalmente automatizada en un corto periodo de tiempo, lo cual supone una gran ventaja en este primer paso del proceso.

Las técnicas de biología molecular se deben realizar en muestras de ADN totalmente puros, para obtener resultados correctos, evitando tanto falsos positivos como negativos. Los métodos de purificación del ADN pueden basarse en diferentes acciones: extracción/precipitación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad. El uso de un tipo u otro dependerá de la muestra obtenida, la cantidad de esta, el tipo de ácido nucleico y la técnica posterior con la que se va a trabajar⁹.

- **Extracción/precipitación:** tiene lugar un primer paso en el que se extraen contaminantes como fenol y cloroformo de la muestra de ácidos nucleicos extraídos, y un segundo paso en el que se precipitan los ácidos nucleicos con isopropanol o etanol. Es un método laborioso y que utiliza productos tóxicos. El fenol y el cloroformo actúan como inhibidores de la reacción de la PCR, por lo que si se utiliza este método es necesario eliminar restos de estos productos para que la posterior reacción de PCR sea correcta¹⁰.
- **Ultrafiltración:** se utiliza una membrana que actúa de filtro sobre la que se coloca la muestra de ácidos nucleicos extraídos y se somete a centrifugación. De esta forma, los ácidos nucleicos libres de sustancias contaminantes quedan retenidos en la membrana y posteriormente se recuperan añadiendo agua o un tampón específico.
- **Ultracentrifugación:** por diferencia de densidad se separan las partículas, las más densas sedimentan y las menos densas flotan. Para favorecer este proceso se lleva a cabo la centrifugación.
- **Cromatografía:** se utiliza una matriz con poros hidrofílicos que dejará pasar las moléculas más pequeñas. Las moléculas grandes quedarán eluidas en el volumen vacío por orden decreciente.
- **Electroforesis:** se basa en la separación de los ácidos nucleicos mediante gel de poliacrilamida. Las moléculas más pequeñas se moverán a mayor velocidad y las más grandes más despacio. Cuando las moléculas de ADN son muy

grandes, se usan geles de agarosa⁹. En función del tamaño de las moléculas, se pueden usar diferentes concentraciones de agarosa o poliacrilamida en el gel.

2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la PCR consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando unos *primers* o cebadores (secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación, que tienen una longitud de 15-30 nucleótidos y son complementarios a la región del ADN que se quiere amplificar). Se basa en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación).

En esta técnica se reproduce lo que tiene lugar en el interior de la célula. La muestra de ADN se añade en un tubo eppendorf junto con los *primers*, los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima (normalmente magnesio). Una vez introducidos todos los reactivos necesarios para el desarrollo de la técnica, se someterán a una serie de ciclos (25-40 ciclos), con cambios de temperatura característicos y que permitirán amplificar la región concreta del ADN de la muestra.



Figura 2. Termociclador, equipo necesario para la realización de la amplificación. Adaptado de Applied Biosystems™.

Cada uno de estos ciclos que forman parte de la técnica de amplificación consta de tres fases, con sus respectivos cambios de temperatura:

- **Fase de desnaturalización:** tiene lugar la rotura de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas ambas hebras del ADN. Se obtienen dos cadenas por separado de ADN que servirán de molde para que se unan los primers y se sintetice una nueva cadena de ADN complementario. Se caracteriza por tener una temperatura elevada (94-96 °C).



Figura 3. Fase de desnaturalización: separación de ambas hebras de ADN. Adaptada de BosterBio®.

- **Fase de apareamiento o annealing:** en esta fase tiene lugar la unión de los primers a la secuencia concreta que ha quedado separada en la fase anterior. La temperatura en esta fase es mucho más baja y dependerá de los primers utilizados (45-55 °C).

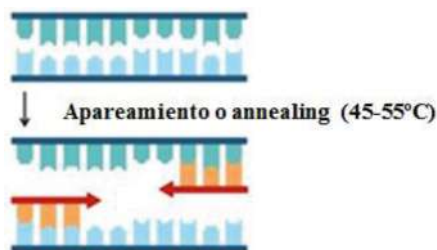


Figura 4. Fase de apareamiento o annealing. Adaptada de BosterBio®.

- **Fase de extensión o elongación:** una vez unido el primer a su cadena complementaria de ADN, la ADN polimerasa realiza su función, añadir nuevos nucleótidos complementarios a la hebra molde obteniendo como resultado una molécula de ADN de doble cadena. En esta fase la temperatura está sobre 72 °C, temperatura de actuación de la Taq polimerasa. La duración de esta fase dependerá de la longitud del fragmento que se desea amplificar. Cada copia generada en un ciclo sirve de molde para los siguientes ciclos, por lo que la amplificación es exponencial, y el resultado es la obtención de millones de copias de un fragmento concreto.

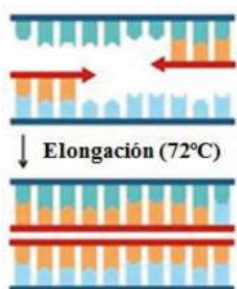


Figura 5. Fase de elongación. Adaptada de BosterBio®.

Se trata de una técnica muy específica debido a que los primers son específicos de una región concreta. Estos son complementarios a la región del ADN que nos interesa (región diana). Además de ser muy específica, presenta una alta sensibilidad, ya que la cantidad de ADN requerida para que se inicie la amplificación es muy baja. Esta técnica también presenta desventajas, es una técnica lenta y su realización requiere de un gran número de pasos, cada uno con riesgo de contaminación.

La PCR convencional se ha utilizado para la detección e identificación de patógenos presentes en alimentos (por ejemplo *Arcobacter spp* en carne aviar), para la identificación de los genes asociados a la virulencia de las diferentes especies y para identificar *E. coli* enterotoxigénica amplificando las enterotoxinas (LT y ST), entre otras aplicaciones¹¹.

Una vez amplificados los fragmentos de interés, estos se someten a un proceso de migración por polaridad a través de un gel de agarosa, influido por dos campos eléctricos. Los

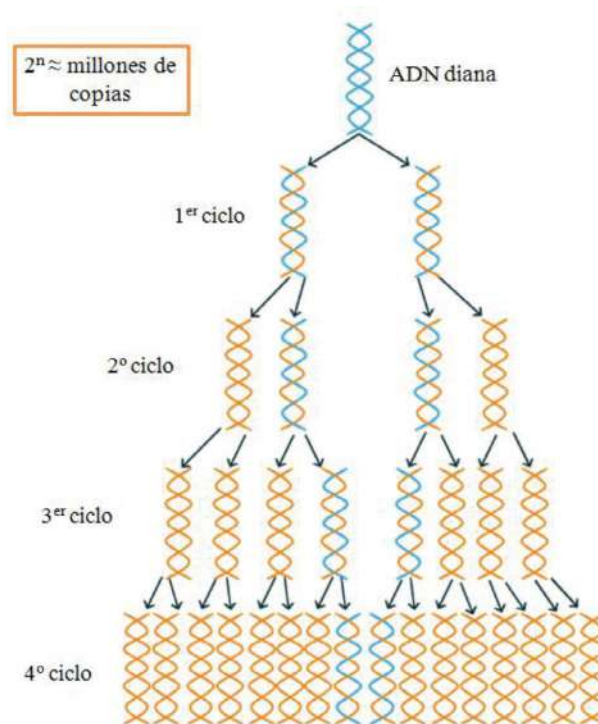


Figura 6. Amplificación del fragmento diana del ADN de forma exponencial. Adaptada de BosterBio®.

ácidos nucleicos poseen carga negativa (aportada por el grupo fosfato), por lo que al realizar la electroforesis van a migrar en dirección al polo positivo. Tiene una gran capacidad de separación de diferentes fragmentos (de 50Kb hasta 2Mb). Esta técnica complementaria a la PCR se utiliza en la detección de patógenos y genes de resistencia a antibióticos¹¹.

Dentro de la PCR podemos encontrar diferentes variantes, teniendo cada una de ellas diferentes características y aplicaciones que favorecen los diferentes diagnósticos. Todas ellas han permitido establecer avances en la tipificación, pudiendo determinar la relación clonal entre diferentes infecciones gracias a la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas¹².

2.2. PCR en tiempo real o qPCR

Esta variante de la PCR añade marcadores fluorescentes con el objetivo de saber la cantidad de ADN inicial en todo momento y detectar la presencia de variaciones genéticas. La emisión de fluorescencia será proporcional al número de moléculas producidas, haciendo que la técnica sea cuantitativa.

Para la realización de esta técnica, además de los reactivos necesarios para la PCR convencional, se necesitan sondas marcadas con enzimas, sustratos antigénicos, radioisótopos, quimioluminiscencia o fluorescencia, con capacidad de unión a la cadena de ácido nucleico que se requiere amplificar. En función del marcado de la sonda, para su interpretación se utilizarán diferentes métodos. Se puede utilizar para la identificación de virus, bacterias y hongos. El fluoróforo marcador más utilizado es el SYBR Green, presenta carga positiva y no emite fluorescencia si está libre

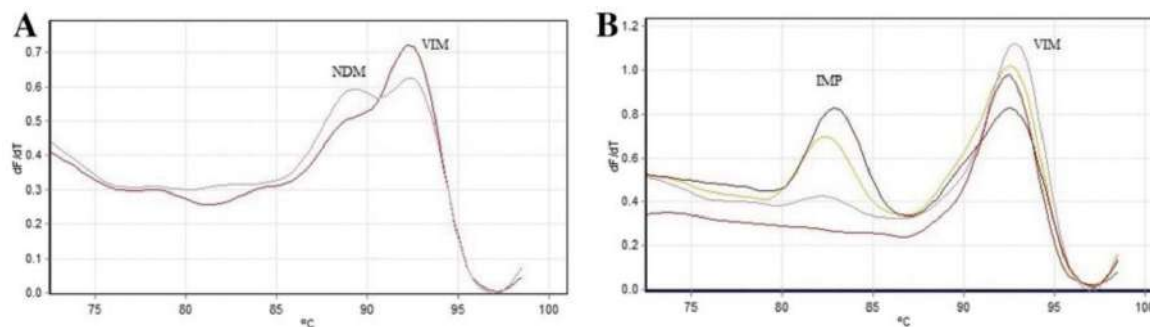


Figura 7. En la imagen A se representan las curvas de melting de dos genes presentes en *Acinetobacter baumannii* (muestras control). En la imagen B se representan las dos muestras control y 3 muestras de pacientes para valorar la presencia o no de los genes en estudio. Tres de las muestras resultan ser positivas para VIM e IMP, mientras que una de ellas es positiva solo para VIM. Adaptada de (14).

pero sí lo hace al unirse al surco menor del ADN⁹. Se utilizan además, sondas de hidrólisis (TaqMan)¹¹.

Tabla 1. Comparación PCR convencional y PCR en tiempo real.

PCR convencional	PCR en tiempo real
Detecta un único segmento del ADN	Detecta y cuantifica el ADN
Amplificación y cuantificación del producto en dos fases	Amplificación y cuantificación en un solo paso
Menor sensibilidad	Mayor sensibilidad
Menor especificidad	Mayor especificidad
Equipos menos costosos	Equipos y reactivos más costosos (sondas fluorescentes más caras)

La velocidad de obtención de resultados y la sensibilidad en la PCR en tiempo real en el diagnóstico de enfermedades infecciosas son mayores que en la PCR convencional¹³. Otra ventaja de esta técnica es que en la mayoría de los casos, no es necesario el paso posterior de evaluación de los productos obtenidos de la PCR mediante el gel de agarosa o poliacrilamida, pues según se está realizando la técnica ya se sabe si el funcionamiento y la obtención de amplificaciones ha sido correcta.

Se pueden utilizar diferentes sondas fluorescentes para marcar genes de varios microorganismos distintos, de forma que se convierte en una PCR en tiempo real múltiple. En este sentido, la qPCR múltiple se puede utilizar para detectar, identificar y cuantificar entre otros, la presencia de patógenos en alimentos (*Campylobacter* spp, *Salmonella* spp). Se considera una buena elección en el análisis de calidad de los alimentos¹¹.

Existen diferentes sistemas comerciales que se basan en la PCR en tiempo real y que se resumen a continuación:

a. Plataforma Light Cycler

Este sistema consta de unos capilares sobre los que se situará la muestra de ADN junto con el resto de los reactivos necesarios para la realización de la PCR y un equipo que registra la emisión de fluorescencia en tiempo real. Se identi-

fican aquí las curvas de fusión o de *melting* que permiten la cuantificación. Se caracteriza por ser un sistema muy rápido. A medida que se van amplificando las copias de ADN se va monitorizando el producto gracias a las sondas marcadas por fluorescencia⁹. Este sistema permite realizar PCR múltiples y cuantificar ARN, para ello, es necesario llevar a cabo previamente la conversión de ARN en ADNc. Entre los microorganismos que se pueden identificar con esta plataforma están:

1. **Bacterias:** *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella* spp., *Salmonella typhi*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *parapertussis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocitogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*.
2. **Hongos:** *Aspergillus fumigatus*, *pan fungus*, *Pneumocitis jirovecii*.
3. **Parásitos:** *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. y patógenos protozoos en heces.
4. **Virus:** herpes virus tipo I, herpes virus tipo II, varicela zoster, virus de Epstein Barr, citomegalovirus, parvovirus B19, JC virus y BK virus.

b. Plataforma Cobas TaqMan 48 2.0

Este sistema se basa en la utilización de la sonda TaqMan, la cual posee un fluoróforo en el extremo terminal 5' y un aceptor de energía (*quencher*), de tal forma que la energía se transfiere desde el fluoróforo hasta el aceptor. Una vez que la sonda TaqMan se une a la cadena de ADN complementaria tiene lugar la liberación de esta energía desde el fluoróforo y esta será medida en fotodetectores presentes en el equipo Cobas 48 2.0.

Mediante esta plataforma se pueden detectar microorganismos como: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1, utilizado en el seguimiento y la monitorización de la carga viral) y virus de las hepatitis B y C y sus cargas virales.

c. GeneXpert®

Esta tecnología utiliza cartuchos de un único uso, específico para cada PCR. En el interior del cartucho se encuentran los reactivos de PCR liofilizados, y en el momento del uso

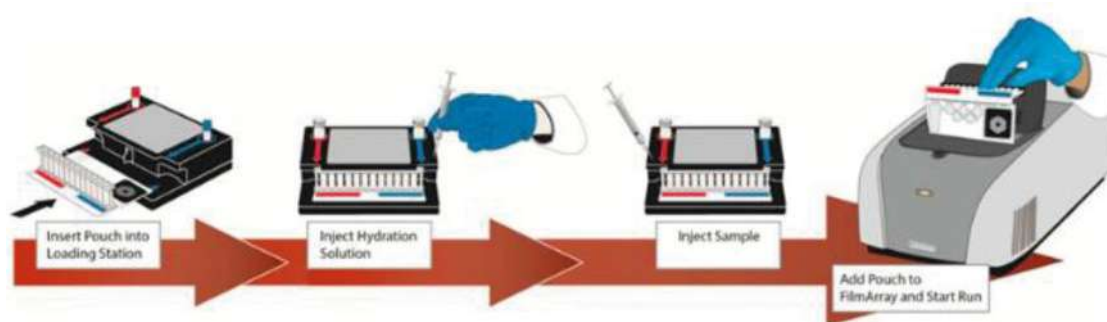


Figura 8. Pasos para la realización del Film Array. 1º: insertar el cartucho en la estación inicial. 2º: Añadir la solución hidratante. 3º: Insertar la muestra. 4º Insertar el cartucho en el FilmArray y empezar el programa. Adaptado de Biomerieux®.

se añaden otros reactivos que acompañan el pack. Es un método muy poco laborioso y sencillo, y se puede utilizar para la identificación de: *Streptococcus* del grupo B, enterovirus del líquido cefalorraquídeo, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*. Además, este equipo permite detectar genes que aportan resistencia a la rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis* y a la meticilina en *Staphylococcus aureus*. En el primer caso, detecta genes que presentan una mutación que hace que se genere una proteína que impide la acción inhibitoria de la rifampicina y en el segundo caso, se amplifica el gen *MecA*, que es el responsable del 97% de los casos de resistencia a la meticilina.

d. Tecnología Abbot®

Se puede realizar el análisis de: VIH-1, VHC, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, virus del papiloma humano, virus de Epstein Barr, virus varicela zoster, parvovirus B19, *Mycobacterium tuberculosis*, virus del herpes simple I y II y carga viral de Citomegalovirus. Este sistema permite realizar el proceso completo, desde la extracción automatizada de la muestra hasta la interpretación de los resultados posterior a la amplificación y detección de la información mediante PCR en tiempo real¹⁵.

e. Tecnología TOCE

Tagging Oligonucleotid Cleavage and Extension es una tecnología basada en el diseño de oligonucleótidos para detectar ADN. Se basa en la realización de un PCR múltiple. Al igual que las comentadas anteriormente, se utilizan unas sondas específicas marcadas con fluorescencia que producirán señal en el momento en el que se haya producido la

extensión del ADN objetivo. Mediante esta tecnología se pueden utilizar diferentes paneles, para detectar patologías respiratorias, meningitis, infecciones de transmisión sexual y patologías a nivel digestivo¹⁶. En el caso de las patologías respiratorias, pueden detectarse las producidas por virus (virus de la gripe, adenovirus, parainfluenza, rinovirus, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus, coronavirus, bocavirus y enterovirus), por bacterias (*Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*) o por micobacterias (*M. tuberculosis*, y micobacterias no tuberculosas)¹⁷. En el diagnóstico de estas patologías respiratorias, se pueden usar muestras como esputo, cultivo, tejido fresco o lavados bronco-alveolares.

f. PCR Lineal Array Genotype

Se trata de un sistema que puede ser utilizado para la identificación de patógenos infecciosos y genes que producen resistencia a tratamientos farmacológicos presentes en dichos agentes patógenos. Uno de sus usos es la determinación de *M. tuberculosis* y sus genes de resistencia y la detección de la presencia de *Helicobacter pylori* y su resistencia a antibióticos¹⁸.

g. Biomerieux Film Array Biofire

Este sistema combina los procesos de preparación de la muestra, la amplificación y detección y el posterior análisis de los resultados. Trabaja mediante paneles, en función de la clínica que presente el paciente (panel de meningitis, de infecciones respiratorias, de digestivas y el panel sanguíneo). Permite obtener resultados preliminares en una hora.

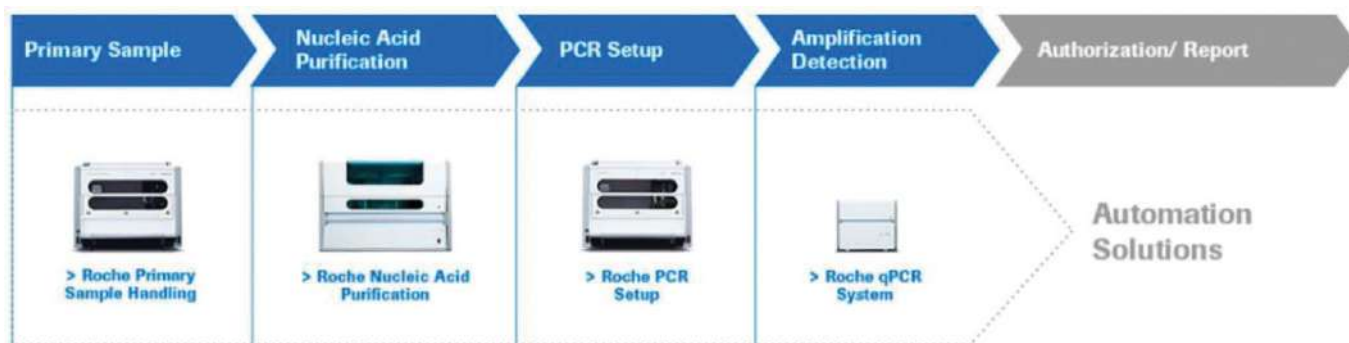


Figura 9. Procesamiento de la muestra, purificación del ácido nucleico, proceso PCR, amplificación y detección de resultados. Adaptado de Roche Diagnostic®.

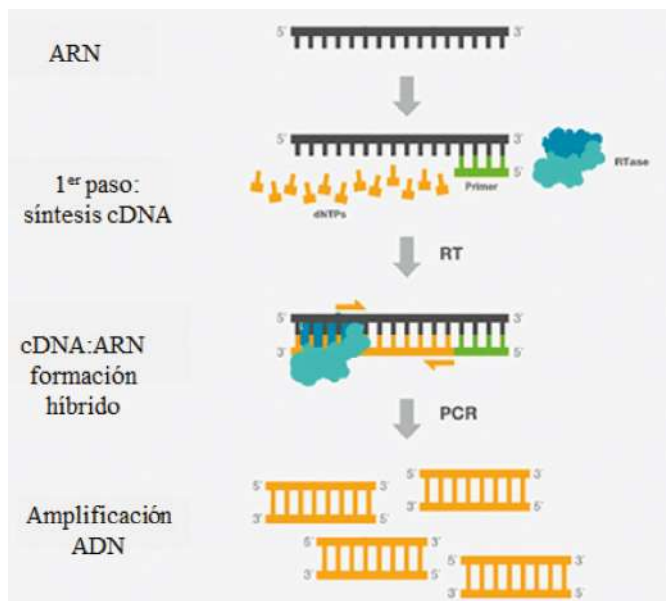


Figura 10. Esquema de los procesos que tienen lugar en la RT-PCR. Adaptada de Thermo Fischer®.

Tabla 2. Tipos de PCR, características y aplicaciones. Adaptada de (3).

Tipo de RPC	Características	Aplicaciones
RPC Estándar	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos partidores. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de un segmento de ADN.
RPC Múltiple	Amplificación de 2 o más segmentos de ADN utilizando varios partidores en una sola reacción de amplificación. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de RPC.
RPC-RFLP (Restriction fragment length polymorphisms)	RPC estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos genéticos (SNPs).
RT (Reverse transcriptase)-RPC	Síntesis de cADN a partir de ARN mediante transcripción reversa, seguido de una RPC.	Expresión de genes. Detección de virus ARN.
RPC-TR (Real time) o qRPC	RPC estándar donde se utilizan tinciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados. Puede ser del tipo multiplex.	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes (asociada a una reacción de transcripción reversa).

h. Sistema Flow

Este sistema consta de diferentes etapas, entre las que se incluye el proceso de extracción del ADN, la purificación de

este y el proceso de amplificación y de detección de resultados. Procesa múltiples muestras a la vez y ofrece resultados en pocas horas. Trabaja también mediante paneles para detectar tanto microorganismos como genes de resistencia en estos microorganismos.

i. Sistema Versant

Permite el análisis de ARN y ADN para identificar diferentes microorganismos (VIH, VHB, VHC, Citomegalovirus, virus Epstein Barr, virus BK, virus varicela zoster, virus del herpes simple (1 y 2), adenovirus, parvovirus B19, *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*).

2.3. Reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Es una variante de la PCR convencional en la que la hebra molde que se utiliza es ácido ribonucleico (ARN). A partir de esta hebra de ARN se sintetiza ADN complementario (cDNA) sobre el que posteriormente se realizará la PCR convencional. Se trata pues, de un método dividido en dos procesos, el primero de ellos, la transcripción inversa y el segundo, la PCR

Sobre esta prueba además existen diferentes variantes:

- *RT-PCR en tiempo real:* basada en la combinación de la RT-PCR con el marcaje fluorescente.
- *RT-PCR multiplex:* permite la amplificación simultánea de varios genes en una única reacción. Se utilizan en este caso más de una pareja de primers.

2.4. PCR digital

La PCR digital (dPCR) se trata de una técnica ultrasensible, por lo que en el diagnóstico de enfermedades infecciosas puede detectar la presencia de microorganismos en concentraciones muy bajas, incluso aquellas que están por debajo del límite de detección de la qPCR. La dPCR proporciona una cuantificación precisa y absoluta de los ácidos nucleicos sin una curva estándar y sin dependencia de la eficiencia de amplificación.

La PCR digital funciona dividiendo una muestra de ADN o ADNc en muchas reacciones de PCR paralelas individuales, depositadas en múltiples pocillos. Aquellos pocillos en los que se amplifique la región diana concreta producirán señal mediante un color, mientras que las negativas no (se utilizan sondas marcadas).

2.5. Microarrays

La técnica de *microarrays* o microarreglos de ADN se basa en la hibridación de sondas cortas que se unen a secuencias cortas de regiones concretas del ADN de la muestra colocadas sobre un soporte sólido. Estas sondas emitirán fluorescencia que será lo que se detecte en un analizador. La detección de ADN por *microarrays* permite analizar simultáneamente un gran número de secuencias de ácidos nucleicos de múltiples patógenos de una única vez. Si el diseño del *microarray* es bueno, es posible identificar ge-

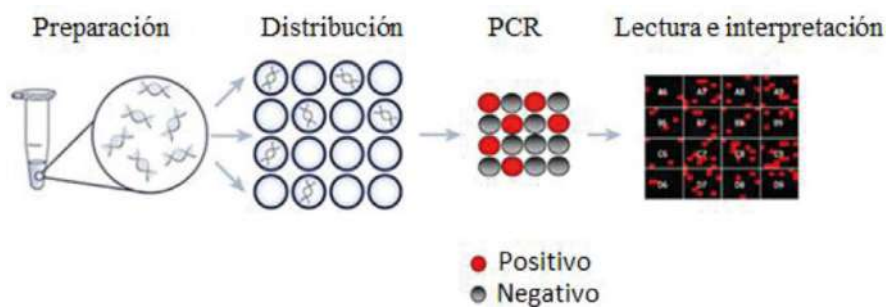


Figura 11. Esquema dPCR. Adaptada de Thermo Fisher®.

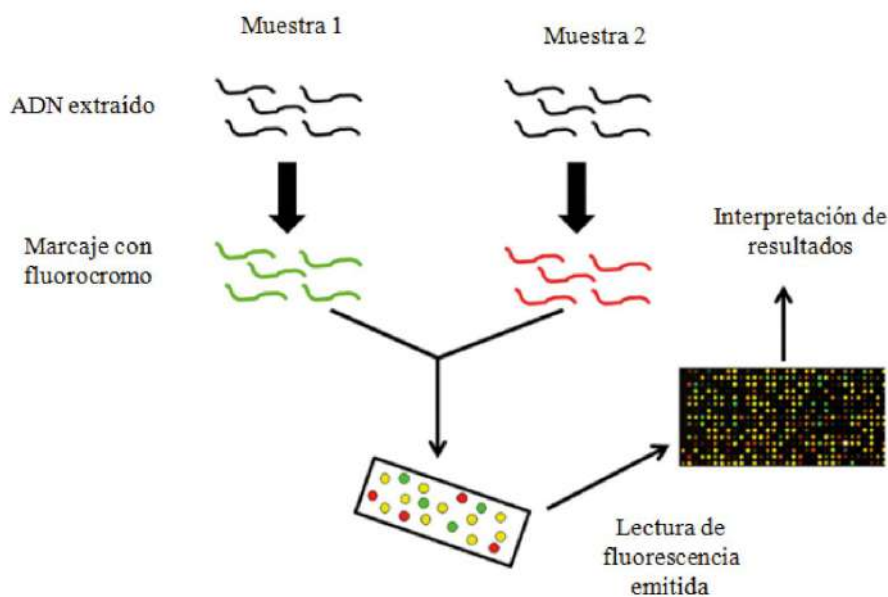


Figura 12. Microarrays de ADN. Adaptado de (19).

nes asociados a factores de virulencia y genes que confieren resistencia a tratamientos antibióticos. Las sondas deben tener una alta complementariedad para que se produzca la unión a la secuencia diana y poder detectar concentraciones muy bajas (aumentar la sensibilidad)¹¹.

Los *microarrays* de ADN se utilizan en la detección de patógenos transmitidos por alimentos (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella* spp y *Escherichia coli*, entre otros), en el diagnóstico clínico, la microbiología clínica y la vigilancia epidemiológica.¹¹

2.6. Secuenciación del genoma

La secuenciación del genoma consiste en determinar la secuencia completa de ADN (orden de las bases Adenina, Citosina, Guanina y Timina) en el genoma. La secuenciación es fundamental para determinar los aminoácidos que codifican un gen en concreto, para el diagnóstico de enfermedades y la detección de mutaciones y resistencias a tratamientos farmacológicos. Estos métodos de secuenciación se basan en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que sintetiza ADN a partir de otro fragmento de ADN produciendo su hebra complementaria. Se pueden obtener secuencias de hasta 500 bases aproximadamente. Dentro de la secuenciación podemos encontrar diferentes métodos, entre los cuales encontramos:

- Secuenciación Sanger.
- Secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS).
- Pirosecuencia.
- Hibridación de sondas de ADN.
- Polimorfismo amplificado aleatorio ADN (RAPD).
- Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP)¹².

a. Secuenciación Sanger

Fue uno de los primeros métodos desarrollados para secuenciar. Se pueden obtener secuencias de hasta 500 pares de bases aproximadamente. Se examinan genes específicos o incluso regiones concretas de un gen. La secuenciación Sanger aporta alta precisión y baja probabilidad de falsos negativos, pero es un método laborioso.

Se basa en el empleo de didesoxinucleótidos (se diferencian de los dioxinucleótidos en que no presentan un grupo hidroxilo en el tercer carbono de la ribosa que forma parte de su estructura) que están marcados por una molécula fluorescente. La ADN polimerasa irá añadiendo de forma inespecífica didesoxinucleótidos o desoxinucleótidos e irá alargando los fragmentos. Cada vez que se añade un didesoxinucleótido la reacción se detiene y se emite una

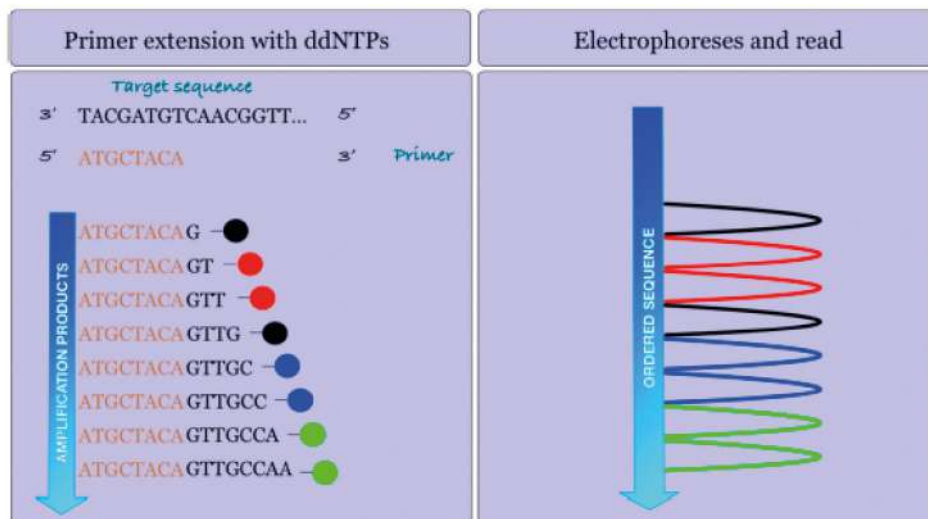


Figura 13. Explicación del proceso Sanger (incorporación de dideoxynucleótidos y posterior señal emitida por fluorescencia de los diferentes fragmentos). Adaptada de (20).

señal fluorescente, que será diferente en función del nucleótido que se haya incorporado. Tras múltiples ciclos de amplificación, se obtendrán gran cantidad de fragmentos con diferente número de nucleótidos, según se hayan ido incorporando a la reacción. Posteriormente se lleva a cabo una electroforesis capilar y se detectarán las diferentes señales que se producen por la molécula fluorescente. Con esto se obtiene la secuencia final del fragmento.

b. Secuenciación masiva en paralelo (SMP) o secuenciación de nueva generación (NGS)

Consiste en establecer el orden de los nucleótidos presentes en las moléculas de ADN o ARN que se pretenden estudiar. Se trata de una técnica de alto costo, pero con un rendimiento alto, que permite amplificar un genoma completo en un solo día, por lo con esta técnica no se examinan genes o regiones específicas. Esta técnica permite detectar mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y variantes estructurales¹².

En cuanto al funcionamiento de la técnica, el ADN o ARN previamente extraído se fragmenta y estos son amplificados en una superficie sólida, donde se agrupan para secuenciarse. La secuenciación se realiza en múltiples ciclos, en los cuales se van añadiendo nucleótidos marcados con fluorescencia, que serán fotografiados y traducidos en la secuencia o el orden que corresponde.

Hay diferentes plataformas de secuenciación masiva (454 Roche, SOLiD, Illumina, Ion Torrent, Pacific Bioscience, Oxford Nanopore) que varían entre sí atendiendo al método de preparación de las plantillas para la secuenciación, la reacción de secuenciación en sí misma y la detección. Además, cada una de estas plataformas puede tener diferentes equipos, diferentes niveles de rendimiento, diferentes números de lecturas y, por lo tanto, el coste económico será diferente^{20,21}.

c. Pirosecuenciación

Se trata de sintetizar la secuencia de ADN con detección en tiempo real. Es utilizada para la identificación de bases

individuales o secuencias cortas de ácidos nucleicos en posiciones concretas¹². Para la realización de esta técnica se necesita la hebra molde que se desea secuenciar, sobre ella se irán uniendo los diferentes nucleótidos (liberados de forma secuencial) gracias a la DNA polimerasa. Cuando esta actúa se libera pirofosfato (PPi), que sirve de sustrato de la ATP sulfurilasa, generándose como producto ATP a partir de ADP. El ATP actúa como sustrato de la luciferasa (que convierte la luciferina en oxiluciferina), y se libera una señal de fluorescencia que es detectada posteriormente. La cantidad de luz emitida es proporcional al número de nucleótidos añadidos. Los dNTPs no incorporados a la secuencia y el ATP son degradados por la apirasa para que no interfieran en la señal de luz.

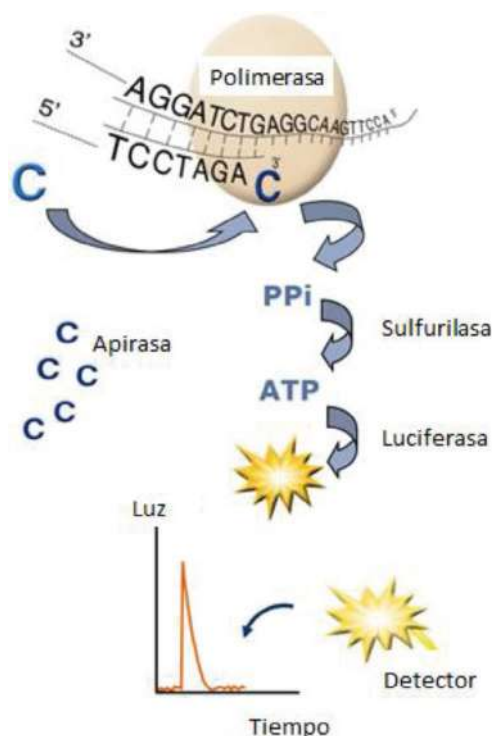


Figura 14. Reacción de pirosecuenciación. Adaptado de Centre for PanorOmic Sciences (CPOS): Genomics services.

Como desventaja, es necesario realizar un pre-enriquecimiento de la muestra, para aumentar la concentración del patógeno y aumentar su sensibilidad y es una técnica de alto coste y compleja. Tiene muchas aplicaciones, entre las que destaca la microbiología, el análisis de agua y la detección de patógenos en alimentos (leche, quesos...) ¹¹.

d. Hibridación de sondas de ADN

La hibridación de sondas se basa en detectar la presencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN), realizando una combinación con una molécula de doble cadena. Algunas se basan en la PCR y tienen utilidad en la identificación de microorganismos patógenos ¹². La hibridación se produce con alta sensibilidad y especificidad, por lo que se pueden identificar especies o cepas concretas del microorganismo que se encuentra produciendo la infección. Se pueden utilizar sondas marcadas con fluorescencia y la posterior visualización al microscopio (hibridación *in situ* o FISH) ⁹. La técnica FISH en poco tiempo puede permitir la identificación, visualización y cuantificación de microorganismos en muestras biológicas. ²²

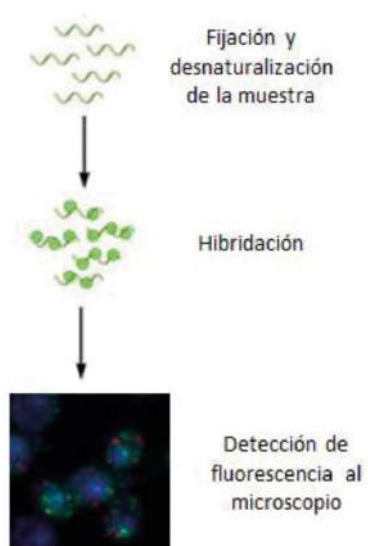


Figura 15. Esquema del procedimiento de FISH. Fuente: elaboración propia.

e. RAPD

Esta técnica se basa en la amplificación aleatoria de ADN polimórfico y es más conocida por el acrónimo inglés RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA). Emplea marcadores moleculares para amplificar por PCR secuencias cortas de ADN polimórfico, utilizando para ello un cebador de secuencia corta (10-12 pares de bases). En microbiología se utiliza para establecer relación entre diferentes especies, por ejemplo entre bacterias y plantas, pero hasta ahora no se ha estudiado en el diagnóstico de enfermedades infecciosas ¹².

f. RFLP

El análisis de fragmentos (Restriction Fragment Length Polymorphisms) consiste en la obtención a partir de enzimas de restricción de secuencias cortas y concretas de ADN. Permite detectar especies bacterianas y su posterior identificación, gracias a variaciones en el RNA ribosomal 16S. Se trata de un método rápido y sensible. ¹²

g. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Se trata de otra posible metodología utilizada en la identificación de microorganismos basada en la amplificación del ADN a una única temperatura, usando una polimerasa muy activa y haciendo que sea una técnica muy rápida. Permite detectar genes relacionados con resistencia a antimicrobianos en menos de media hora con una sensibilidad y especificidad muy alta ²³.

3. PATOLOGÍAS

3.1. Sepsis

La sepsis se define como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica consecuencia de un estímulo infeccioso (presencia de bacterias en la sangre) y que está asociada a una elevada morbilidad. Según diversos estudios, se estima que la mortalidad asociada a sepsis en pacientes europeos y norteamericanos es de 400.000 pacientes cada año ²³. La identificación e

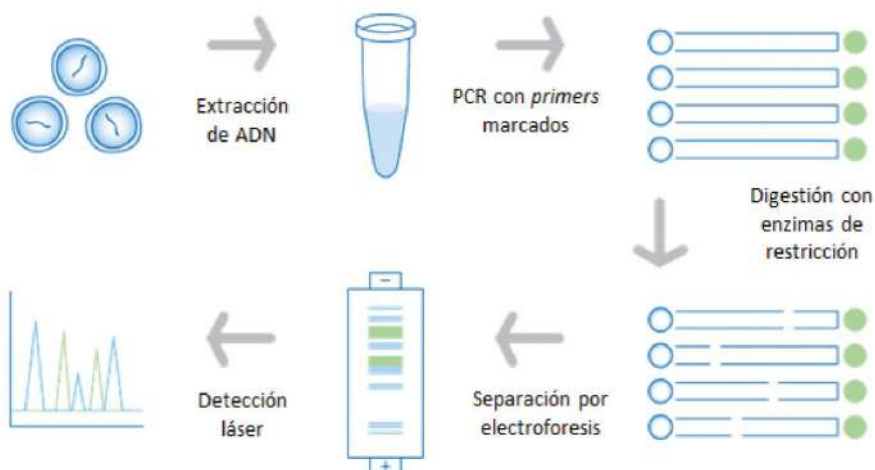


Figura 16. Esquema del procedimiento de RFLP. Adaptada de Thermo Fisher®.

instauración precoz de tratamiento empírico es fundamental para disminuir las complicaciones asociadas a la sepsis.

Aunque el hemocultivo sigue siendo actualmente el método de diagnóstico de la bacteriemia, su uso en la práctica tiene diversas desventajas:

- Retraso en la obtención de resultados.
- Contaminación por microorganismos pertenecientes a la microbiota normal de la piel.
- Falta de positividad en muchos casos, siendo aún menor en aquellos pacientes que han iniciado tratamiento antibiótico y en aquellos cuya infección está causada por hongos o por bacterias de crecimiento lento o necesidades especiales.
- Factores asociados a la propia extracción de la muestra (momento de la extracción, volumen de la muestra, localización anatómica de extracción de la muestra, entre otros)².

Las nuevas técnicas basadas en la biología molecular (detección de ADN del microorganismo causante de la infección) ofrecen múltiples ventajas, la principal la rapidez con la que se obtiene el resultado². Un retraso en la instauración de un tratamiento antibiótico adecuado aumenta en gran medida el riesgo de mortalidad (7,6% por cada hora sin tratamiento antibiótico).

Con las pruebas de diagnóstico molecular se están consiguiendo minimizar las limitaciones que hasta ahora existen con el hemocultivo, entre ellas, la posible identificación del microorganismo causante aun después de haber iniciado tratamiento antibiótico.

Con los nuevos avances se han conseguido detectar patógenos que frecuentemente son responsables de sepsis y genes de resistencia (gen *mecA* y genes que codifican BLEES y carbapenemasas, entre ellos). Una de las ventajas de la biología molecular en el diagnóstico de sepsis es la rapidez con la que es posible identificar al microorganismo responsable, ya que evitas el tiempo de espera de crecimiento en el hemocultivo⁵. Pero también existen desventajas, entre las que encontramos:

- Presencia de ADN humano que puede interferir en los resultados.
- Persistencia de ADN de microorganismos muerto.
- Sustancias inhibitorias presentes en la sangre (hierro, hemoglobina, heparina, entre otras) que afectan a la eficacia de extracción, detección e identificación del ADN del patógeno. A la hora de la extracción de muestra se debe evitar heparina de litio o sodio como anticoagulante y en su lugar se recomienda la utilización de EDTA.
- Bajo número de microorganismos circulantes en la sangre.
- Estas técnicas no permiten aportar información sobre la sensibilidad microbiana².

Por estas razones, el hemocultivo sigue utilizándose hasta la fecha y se considera la biología molecular como una prueba complementaria. La PCR cuantitativa (qPCR) se considera un marcador útil para la evaluación de la eficacia del tratamiento y el pronóstico en pacientes con infecciones bacterianas agudas, ya que permite cuantificar la carga bacteriana⁵.

Algunos de los sistemas que se han empleado en la detección e identificación de microorganismos en pacientes sépticos son: LigthCycler Septifast, Magicplex Sepsis Real-Time, SepsiTest y VYOO.

El sistema LightCycler Septifast consiste en la extracción directamente de la sangre de ADN, purificarlo y posteriormente realizar 3 PCR múltiples (una para bacterias gram negativas, otra para gram positivas y otra para hongos). Para las bacterias utiliza las secuencias localizadas entre el 16S y el 23S del ADN ribosomal y para los hongos las secuencias entre el 18S y el 5,8S. Con este sistema, además de poder identificar de una sola vez 25 patógenos diferentes (*Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter (cloacae/aerogenes)*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*; cocos gram-positivos: *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus pneumoniae*, otras especies de *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, 5 especies de *Candida* y *Aspergillus fumigatus*), se puede detectar la presencia del gen *mecA* relacionado con la resistencia de algunos microorganismos a la metilicina. La cantidad de muestra necesaria es muy poca y el tiempo de obtención de resultados varía de 3,5 a 6 horas en función de los resultados obtenidos. La especificidad de la técnica es elevada y la sensibilidad es mayor en bacterias que en hongos (80% y 61%, respectivamente)²³.

El sistema Magicplex Sepsis Real-Time se basa en la realización de una primera PCR convencional y una segunda PCR en la que los *primers* están marcados con una sustancia fluorescente y permite la detección a tiempo real. En cuanto a su utilidad en la práctica, permite detectar mayor cantidad de microorganismos (73 bacterias gram positivas, 12 bacterias gram negativas y 6 hongos). Además, no sólo permite detectar el gen *mecA*, sino que también puede detectar la presencia de *vanA* y *vanB* (relacionados con la resistencia a Vancomicina). En cuanto a volumen de sangre necesario y tiempo de obtención de resultados es muy similar al sistema anterior²³.

El sistema SepsiTest utiliza *primers* dirigidos a dianas del ARN ribosomal de bacterias (16S) y hongos (18S) para la realización de un PCR. Se obtendrá como resultado de la PCR si hay o no presencia de bacterias u hongos y en el caso de que sea positivo, se secuencia para identificar finalmente al microorganismo. Permite identificar 345 microorganismos patógenos, tanto en sangre como en otros líquidos biológicos. La primera parte de la técnica, saber si hay presencia o no de microorganismo en la muestra requiere 4 horas, y la posterior identificación en casos positivos otras 4 horas, por tanto el tiempo total requerido para la identificación del microorganismo causante de la infección es de 8 horas. Este test además, es capaz de detectar

aquellas infecciones polimicrobianas con una sensibilidad mayor que el hemocultivo clásico. Como inconveniente, destacar que aún no está capacitado para la detección de genes de resistencia²³.

VYOO es otro de estos sistemas basado en una PCR múltiple que permite detectar las 34 bacterias y los 7 hongos más frecuentes implicados en las infecciones sistémicas, además de 5 genes de resistencia. La identificación tiene lugar después de la amplificación y se realiza mediante tecnología de *microarrays*. Entre los posibles microorganismos que pueden identificarse, además de los más habituales, destacan *H. influenzae*, *N. meningitis*, diversos anaerobios, *A. fumigatus* y *Candida spp.* (las cinco especies más frecuentes). Los genes de resistencia determinados son: *mecA*, *vanA*, *vanB*, genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): *blaSHV* y *blaCTX-M*, incluyendo algunas variantes. El tiempo requerido para la identificación del microorganismo es de 7,2 horas²³.

Existe un nuevo instrumento utilizado también en el diagnóstico de las septicemias llamado Genalysis. Es una combinación de secuenciación del ADN con un sistema de captura inmunomagnético que captura el agente patógeno en menos de media hora.

Otra de las técnicas que puede emplearse en la identificación de los microorganismos en sangre es la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que se basa en la unión específica de sondas de ácidos nucleicos fluorescentes con secuencias complementarias de ADN del microorganismo (ARN ribosómico 16S para bacterias y 18S para hongos). Destacan la rapidez con la que se obtiene el resultado (30 minutos-3 horas) y la elevada sensibilidad y especificidad. Además, aunque en un tiempo más largo (6 horas) se puede determinar la sensibilidad a los antibióticos.

3.2. Infecciones respiratorias

Las enfermedades respiratorias son muy frecuentes tanto en adultos como en niños en nuestro medio: resfriados comunes, gripe, faringitis, amigdalitis, epiglotitis, otitis, bronquitis, bronquiolitis, entre otras. En la población pediátrica, los principales virus causantes de infección respiratoria aguda son el virus respiratorio sincitial, el virus influenza A y B, el virus parainfluenza, el adenovirus, el rinovirus, el metapneumovirus, el bocavirus y el coronavirus²⁴. Entre las bacterias, destaca *Streptococcus pyogenes* como principal causa de faringitis y *Streptococcus pneumoniae* como causa de enfermedad respiratoria de las vías inferiores²⁵.

El diagnóstico de las infecciones respiratorias es un reto, ya que en numerosas ocasiones no se consigue llegar al microorganismo o a los microorganismos causantes. En muchos casos existe coinfección entre virus y bacterias. La clínica de la patología en muchos casos coincide, por lo que no es posible establecer un diagnóstico etiológico basándose únicamente en los síntomas y signos del paciente.

Los métodos de diagnóstico convencionales para los virus se basan en la detección de antígenos mediante inmunofluorescencia (IF) y/o el cultivo viral. Se trata de métodos efectivos, pero presentan limitaciones, entre ellas, baja sensibilidad, alto coste (en el caso del cultivo) y gran cantidad

de falsos negativos entre sus resultados, como se puede concluir a partir del estudio realizado por Corvalán et al. basado en el análisis de muestras por técnicas convencionales y moleculares²⁴.

El desarrollo de las técnicas moleculares además de incluir la posibilidad de detección de más de un patógeno, permite hacerlo usando directamente la muestra obtenida. Por supuesto, permite la instauración temprana de un tratamiento antibiótico y el aislamiento del paciente, si fuese necesario en función del microorganismo causante. A pesar de la realización de la técnica molecular, sería necesario también realizar un cultivo para obtener los datos relacionados con la sensibilidad antibiótica o las variaciones de la composición antigénica, que permitiría desarrollar vacunas eficaces⁵.

Existen técnicas moleculares que se consideran buenas alternativas para el diagnóstico de enfermedades respiratorias, entre ellas, la RT-PCR. Se trata de técnicas rápidas, sensibles y específicas. Por otro lado, se están realizando avances en la utilización de NGS para la identificación de virus en muestras respiratorias. Tal es el caso de un estudio realizado por Thorburn et al. en el que se compara la técnica RT-PCR con la NGS en la detección de RNA de virus en muestras respiratorias. En este estudio se obtienen buenos resultados de sensibilidad y especificidad por ambos métodos, aunque estas son mayores en la técnica RT-PCR, por lo que se sigue considerando mejor técnica. A pesar de los resultados, la NGS aporta mayor información acerca de los tipos de virus respiratorio sincitial y metapneumovirus y de los subtipos de rinovirus y enterovirus²⁶. También hay estudios basados en NGS para la identificación y caracterización rápida del serotipo de Adenovirus, importante a la hora de establecer posibles complicaciones tras la infección²⁷.

El uso de sistemas basados en paneles de detección de microorganismos ha supuesto grandes avances a la hora de realizar el diagnóstico en el paciente, pues, de forma simultánea, se permite analizar la posible infección de varios agentes patógenos, por lo que pueden aportar información sobre coinfecciones. Los primeros paneles de detección de virus respiratorios basados en PCR múltiple fueron aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA) en 2009 (Tabla 3). Estos paneles están orientados a la identificación de microorganismos a partir de muestras variadas, como son el exudado nasofaríngeo o el lavado broncoalveolar⁷. Aportan alta sensibilidad y especificidad y se obtienen resultados en periodos de tiempo muy corto. El inconveniente de estas técnicas es que pueden detectar microorganismos viables y no viables, que podrían dar lugar a resultados confusos.²⁵

La gripe es una enfermedad que se produce a nivel mundial cada año y es responsable de grandes epidemias. Está asociada a absentismo laboral y escolar en multitud de pacientes y en algunos casos, puede producir complicaciones graves. La detección del virus de la gripe se puede realizar mediante RT-PCR (técnica sensible y específica, pero que requiere analizadores específicos y la extracción previa de ARN), técnicas Point Of Care (POC, técnica muy rápida, pero menos sensible y específica que las PCR, permite identificar el tipo de virus, pero no subtipos, por lo

Tabla 3. Comparación de diferentes sistemas de análisis con paneles respiratorios. Adaptada de (7).

Patógeno	FilmArray	eSensor	Verigene	Luminex xTAG		
				RVP	RVP Fast	NxTAG
Adenovirus	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Coronavirus	✓					✓
Bocavirus humano						✓
Metapneumovirus	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Virus Influenza	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Virus Parainfluenza	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Virus Respiratorio Sincitial	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Rinovirus/Enterovirus	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	✓					✓
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	✓					✓
<i>Bordetella pertussis</i>	✓		✓			

que en casos positivos se requiere métodos complementarios) y secuenciación (aportan mucha más información sobre el virus, pero requieren más tiempo y procesos mucho más laboriosos)²⁸.

Los dos genes más importantes que codifican el virus de la gripe son la hemaglutinina y la neuraminidasa, y pueden ser analizados mediante estas pruebas, además de aportar información sobre la evolución del virus y el grado de relación entre las diferentes áreas geográficas⁹. Para la determinación de la infección por virus Influenza y virus respiratorio sincitial, existen diferentes sistemas de análisis. Uno ellos recibe el nombre de Enigma MiniLab influenza A/B & RSV, su uso está extendido en toda Europa, tiene una duración de 90 minutos, es muy poco laborioso, por lo que no se necesita personal técnico muy cualificado y utiliza hisopos nasofaríngeos como muestra del paciente²⁹. En el caso de la gripe, se ha observado que los resultados son más sensibles y específicos cuando se emplean técnicas en las que sólo se analiza la presencia de virus Influenza A y B y no aquellos en los que se utilizan técnicas combinadas (múltiples virus y bacterias de forma simultánea)³⁰.

La neumonía asociada a la comunidad es otra de las enfermedades respiratorias más frecuentes y con una mortalidad asociada muy elevada (2-14%). El desarrollo de las técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades infecciosas permite analizar múltiples agentes patógenos posiblemente causantes de la neumonía del paciente. Entre los agentes causantes de neumonía destacan virus y bacterias, y los principales responsables de neumonía atípica son *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Bordetella pertussis*. El principal inconvenien-

te en estos casos es la posible contaminación de la muestra extraída con bacterias propias del tracto nasofaríngeo. Este problema puede resolverse a partir del uso de PCR basadas en la cuantificación, basándose en datos cuantitativos para diferenciar contaminación de infección³¹.

El diagnóstico de la tos ferina, enfermedad producida por *Bordetella pertussis*, se puede realizar mediante técnicas de cultivo microbiológico (pero es difícil y aporta baja sensibilidad), ensayos de inmunofluorescencia y diagnóstico molecular. El diagnóstico molecular se realiza a partir de la PCR (lo que aporta una mayor sensibilidad y por tanto mejores resultados en el diagnóstico⁷. La mayoría de los sistemas comercializados para el diagnóstico de la infección por *Bordetella* no diferencian entre especies (*Bordetella pertussis* y *Bordetella holmessi*), pero Martini et al. han realizado un estudio añadiendo más dianas al análisis para aportar especificidad y mejorar el diagnóstico de la infección por *Bordetella pertussis*³².

Recientemente se ha estudiado una técnica basada en LAMP, que ofrece como ventajas el bajo coste del test, la rapidez con la que se puede obtener el resultado y la no utilización de instrumentos especializados para su realización³³.

3.3. Infecciones gastrointestinales (gastroenteritis y enterocolitis)

Las infecciones gastrointestinales son una de las patologías más frecuentes en atención primaria. Dentro de las infecciones del tracto gastrointestinal podemos diferenciar las infecciones producidas por *Helicobacter pylori* y

las gastroenteritis y enterocolitis. Estas últimas pueden ser producidas por múltiples patógenos, los cuales producen síntomas muy similares, que con frecuencia no son graves y cesan de forma espontánea en poco tiempo³⁴. Pueden ser causadas por virus, bacterias y parásitos, por lo que establecer el agente causal supone un reto en muchos casos, siendo imposible de identificar en muchas ocasiones. Las razones por las cuales en muchas de las ocasiones no se detecta el agente patógeno, utilizando las técnicas microbiología clásica, pueden ser: no todos los patógenos se buscan de forma rutinaria (por ejemplo los poco frecuentes), la labilidad de algunos microorganismos (por ejemplo, *Shigella* spp.), la baja sensibilidad del método utilizado o que el microorganismo causante sea un enteropatógeno desconocido.

Tradicionalmente, el diagnóstico se ha basado en el cultivo bacteriano, pruebas microscópicas con el objetivo de identificar huevos y parásitos responsables y técnicas rápidas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo o inmunofluorescencia, entre otras. Pero con el desarrollo de las técnicas moleculares, la identificación ha mejorado.

Las técnicas moleculares empleadas en el diagnóstico de infecciones a nivel gastrointestinal pueden realizarse bajo dos enfoques diferentes, el primero de ellos, cuando se va buscando un microorganismo concreto y se detectan mediante PCR uno o varios genes de un mismo microorganismo (ej: *Clostridium difficile* o detección de norovirus) y el segundo, cuando se desconoce el microorganismo causante y se busca mediante PCR múltiple al microorganismo o los microorganismos responsables (puede realizarse para la búsqueda de bacterias, virus y parásitos). En este último caso, puede orientarse hacia cada uno de estos grupos de forma independiente, o pueden combinarse. Hay disponibles paneles que incluyen la extracción de la muestra, la amplificación de los fragmentos diana y la detección e identificación de los productos amplificados. Esto permite mayor velocidad en la obtención de resultados y una gran automatización. El problema de estas técnicas es que no pueden distinguir entre la infección y la colonización. Diversos estudios han demostrado que 27%-33% de las muestras que resultan positivas en un panel contienen más de un agente patógeno⁷. Además, pueden identificar una carga de patógeno muy pequeña pero esta puede no ser la responsable del cuadro clínico del paciente. Algunos estudios, observan que la cuantificación de la carga genética de enteropatógenos podría relacionar o no al patógeno encontrado con el cuadro clínico. Pero para ello, es necesario un método más preciso que cuantifique a los microorganismos enteropatógenos en las heces. En el caso de que se trate de una bacteria, a pesar de los avances, es necesario procesar la muestra para aislarla y realizar pruebas de sensibilidad⁵.

Uno de los paneles disponibles se llama FilmArray, está basado en PCR en tiempo real y permite detectar múltiples microorganismos, virus, bacterias y parásitos, de forma simultánea y con un tiempo de procesamiento de aproximadamente 1 hora. En el panel de FilmArray se pueden detectar 22 patógenos de los cuales, 13 son bacterias, 5 virus y 4 parásitos (Tabla 4). En un estudio realizado por Beal et al. se identificó, mediante el uso de este panel, al menos un microorganismo en un número de muestras mayor al número identificado por métodos convencionales. Además, en este

mismo estudio se observaron coinfecciones en un 28,3% de las muestras³⁵.

Otro panel ampliamente utilizado en el estudio de muestras digestivas para la identificación de agentes patógenos es el xTAG (Luminex Assay), cuyos resultados aportan una mayor sensibilidad que la PCR en tiempo real convencional (36). En este panel se pueden detectar 11 patógenos, 7 bacterias, 2 virus y 2 parásitos (Tabla 4). Para la realización de este panel son necesarios 10µL de muestra de ADN ya purificados. Cuando en la muestra está presente el ADN del microorganismo se emitirá fluorescencia que podrá ser detectada e interpretada teniendo en cuenta la sospecha de la infección. El tiempo de procesamiento de este panel varía entre 5-6 horas incluyendo el tiempo de preparación de la muestra y pueden ser procesadas de forma simultánea 96 muestras³⁷.

Además, teniendo en cuenta que la muestra biológica más ampliamente utilizada en estos casos son las heces, es posible realizar la PCR digital, que minimiza los niveles de inhibidores de PCR presentes de forma natural en las heces y que por tanto va a permitir obtener mejores resultados a la hora de identificar el agente causal de la infección³⁶.

Además de establecer el agente causal de la infección o realizar estudios de sensibilidad a tratamientos farmacológicos, se han realizado estudios moleculares con otros fines. Entre ellos, valorar si el ciclo umbral (Ct) de la PCR en tiempo real pudiera estar relacionado con la gravedad de la infección y permitiría establecer relación con la mortalidad producida por una infección. Tal es el caso del estudio realizado por Sante et al. en el que se estudia la relación entre el Ct en infecciones producidas por *Clostridium difficile* y la gravedad de la infección, y en el que no se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos³⁸.

Entre los parásitos responsables de patología a nivel digestivo destacan diferentes especies de *Entamoeba* (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar* y *E. moshkovskii*) y de *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum*) y sólo pueden diferenciarse entre sí por métodos moleculares³⁴.

Los virus que con mayor frecuencia se asocian a patología digestiva son: rotavirus, astrovirus, adenovirus y norovirus. Para su diagnóstico también son importantes los métodos moleculares. Las técnicas moleculares se basan en la PCR o RT-PCR (en función de si el virus es de ADN o ARN, respectivamente) y permiten diferenciar serogrupos diferentes³⁴. Uno de los ensayos comercializados específico para norovirus es Quantitative genogroup II (basado en RT-PCR)³⁹.

En el caso de las bacterias, las bacterias mayormente implicadas en cuadros digestivos son: *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Campylobacter* spp. y *Helicobacter pylori*. Las cepas patógenas de *Clostridium difficile* producen dos toxinas, A y B, responsables de la patogenicidad y pueden detectarse en muestras biológicas mediante PCR con alta especificidad y sensibilidad, aunque el coste económico es elevado⁴⁰.

Tabla 4. Patógenos detectados en paneles comerciales para el diagnóstico de gastroenteritis. Adaptada de (34).

	Virus	Bacterias	Parásitos
FilmArray (bioMérieux)	Rotavirus A Norovirus GI/GII Adenovirus 40/41 Sapovirus Astrovirus	<i>Aeromonas</i> <i>Campylobacter</i> <i>Clostridium difficile</i> (toxinas A/B) <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>Escherichia coli</i> : ECEA, ECEP, ECET, ECTS (stx1 y stx2), <i>E. coli</i> O157, ECEI/ <i>Shigella</i> <i>Campylobacter</i> <i>C. difficile</i> (toxinas A/B) <i>Salmonella</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>E. coli</i> : ETEC, ECTS (stx1 y stx2), <i>E. coli</i> O157, ECEI/ <i>Shigella</i>	<i>Cryptosporidium</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cyclospora cayentanensis</i>
xTAG GPP (Luminex)	Rotavirus A Norovirus GI/GII Adenovirus 40/41	<i>Campylobacter</i> <i>C. difficile</i> (toxinas A/B) <i>Salmonella</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>E. coli</i> : ETEC, ECTS (stx1 y stx2), <i>E. coli</i> O157, ECEI/ <i>Shigella</i>	<i>Cryptosporidium</i> <i>E. histolytica</i> <i>G. lamblia</i>
Verigene (Luminex)	Rotavirus A Norovirus GI/GII	<i>Campylobacter</i> <i>Salmonella</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Vibrio</i> spp. <i>E. coli</i> : ECTS (stx1 y stx2), ECEI/ <i>Shigella</i>	
Seeplex (Seegene)	Panel 1 Norovirus GI Norovirus GII Rotavirus Adenovirus Astrovirus Sapovirus	Panel 2 <i>Salmonella</i> spp. ECEI/ <i>Shigella</i> spp. <i>Vibrio</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>C. difficile</i> Toxina B <i>Y. enterocolitica</i> <i>Aeromonas</i> spp. Panel 3 <i>C. difficile</i> hypervirulent <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O157:H7, ECEH (stx1/2), ECEP (<i>eaeA</i>), ECET (<i>It/st</i>), ECEA (<i>aggR</i>) <i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i> <i>C. difficile</i> (<i>tcdA</i> , <i>tcdB</i>) <i>E. coli</i> : ECEH, ECEP, ECET, ECEI/ <i>Shigella</i> spp.	Panel 4 <i>G. lamblia</i> <i>E. histolytica</i> <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Blastocystis hominis</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>C. cayentanensis</i>
RIDA® GENE (R-Biopharm)	Norovirus GI/GII Rotavirus	<i>Salmonella</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i> <i>C. difficile</i> (<i>tcdA</i> , <i>tcdB</i>) <i>E. coli</i> : ECEH, ECEP, ECET, ECEI/ <i>Shigella</i> spp.	<i>G. lamblia</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>E. histolytica</i> <i>D. fragilis</i> <i>G. lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i>
Faecal pathogens A (AusDiagnostics)	Rotavirus A Norovirus G1/G2, Adenovirus F/G	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>C. difficile</i> (toxina B) <i>Y. enterocolitica</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. ECTS (stx1/stx2) <i>Vibrio</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i>	<i>D. fragilis</i> , <i>E. histolytica</i> <i>B. hominis</i>
Enteric Pathogens [EP] Test (Nanosphere)	Norovirus, Rotavirus	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. ECTS (stx1/stx2) <i>Vibrio</i> spp. <i>Y. enterocolitica</i>	

Escherichia coli es responsable tanto de patología adquirida fuera del ámbito hospitalario como nosocomial y cursa con diarrea, que puede complicarse en algunos casos a síndrome hemolítico-urémico. Este síndrome suele estar producido por *E. coli* productora de toxina *Shiga* y la identificación de este genotipo en el momento del diagnóstico puede hacer que la evolución de la patología sea diferente, evitando complicaciones o favoreciendo la aparición de este síndrome de forma más leve. Para ello, recientemente se está utilizando un sistema de análisis basado en la repetición en tándem de un número variable de locus (MLVA). Este sistema consiste en realizar PCR con *primers* para cada región seguidos de electroforesis y permite identificar el genotipo de la bacteria. Esta técnica se emplea para la determinación del genotipo de *E. coli* y *Shigella*, basándose en 6 loci previamente descritos y en el análisis de varias cepas, obteniendo buenos resultados⁴¹. Para la diferenciación de especies de *Campylobacter* (*C. jejuni* y *C. coli*) existen métodos moleculares que aunque se ha visto que son sensibles no están totalmente validados⁴².

La infección por *Helicobacter pylori* puede desencadenar en grandes complicaciones: úlceras, linfomas asociados a

mucosa gástrica y adenocarcinomas entre otras. Tradicionalmente se han utilizado cultivos para su identificación, pero actualmente pueden utilizarse métodos moleculares (basados en PCR en tiempo real), que permiten además obtener información acerca de mutaciones presentes en la bacteria relacionadas con resistencia a antibióticos. Para combatir la infección frente a *Helicobacter pylori* se utilizan terapias combinadas de varios antibióticos, por lo que las resistencias que pueden aparecer son múltiples. Se ha observado en Europa un gran aumento de resistencia a claritromicina y metronidazol⁴³. El gen 23S *ARNr* responsable de resistencia a macrólidos (claritromicina), el gen *gyrA* ofrece resistencia a fluoroquinolonas, el gen 16S *ARNr* a tetraciclinas, el gen *rpoB* a rifabutin y el gen *pbp-1a* a amoxicilina. La mayoría de los kits trabajan con muestras de biopsia, aunque hay ya algunos comercializados y en estudio que se basan en muestras de heces^{34,44}.

Los métodos basados en la biología molecular también se han abierto paso en la detección e identificación de patógenos transmitidos por alimentos, en el procesamiento de los alimentos y su envasado. Algunos de estos pató-

genos son responsables de cuadros gastrointestinales que pueden dar lugar a grandes complicaciones en la salud de los pacientes. Dentro de los patógenos que se transmiten por alimentos podemos encontrar dos grupos:

- Patógenos que se multiplican dentro del tracto gastrointestinal (algunos ejemplos son: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio parahemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, especies termófilas de *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli enteropatogena* y *Streptococcus spp.*).
- Patógenos causantes de la patología por producción de toxinas (algunos ejemplos son: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*).

Los métodos moleculares pueden detectar la presencia de estos microorganismos directamente del alimento, sin utilizar medios selectivos para su aislamiento, por lo que el tiempo de obtención de resultado es corto. Si se quiere obtener una mayor concentración de ADN sería necesario realizar una etapa previa, de enriquecimiento con el que se conseguiría una mayor sensibilidad. Las técnicas utilizadas con más frecuencia son: PCR, qPCR, *microarrays*, secuenciación y electroforesis en gel.¹¹

3.4. Infecciones que afectan al Sistema Nervioso Central

Las principales patologías que afectan al sistema nervioso central (SNC) y resultan de interés a nivel microbiológico son la meningitis y la encefalitis de origen infeccioso. Se trata de dos patologías muy importantes, con muchas complicaciones y secuelas asociadas. Las infecciones del sistema nervioso central están asociadas a una gran morbimortalidad, por eso, los diagnósticos clínico y microbiológico son de vital importancia, para instaurar un tratamiento precoz y eficaz. La muestra utilizada en estos casos es el líquido cefalorraquídeo, donde además de las pruebas microbiológicas clásicas (tinciones de Gram, Ziehl-Neelsen, tinta china, detección de antígenos y diferentes cultivos) se realizan técnicas moleculares. El cultivo de estas muestras continúa siendo la prueba de referencia para el diagnóstico de bacterias y hongos, mientras que la extracción de ADN con la posterior amplificación se utiliza de forma rutinaria para el diagnóstico de virus.

Las técnicas moleculares favorecen el diagnóstico y la monitorización de la meningitis, aunque sigue siendo necesario el cultivo para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos. Permiten dirigir el tratamiento en función del agente patógeno (ya sea bacteriano o vírico), aunque esta información ya puede orientarse con el análisis bioquímico y celular del líquido cefalorraquídeo. Actualmente existen en el mercado paneles de detección múltiple de microorganismos responsables de infecciones a nivel del sistema nervioso central⁵.

Uno de estos paneles (FilmArray panel de meningitis y encefalitis de BioFire Diagnostics) analiza la presencia de 16 agentes patógenos, entre los que se incluyen bacterias, virus y hongos. Para ello, necesita aproximadamente 200 microlitros de muestra de líquido cefalorraquídeo y emplea una hora para llegar al diagnóstico. Los microorganismos que incluye este panel son:

- Bacterias: *Escherichia coli K1*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae*.
- Virus: Citomegalovirus, Enterovirus, Virus del Herpes Simplex tipo 1, Virus del Herpes Simplex tipo 2, Herpes virus tipo 6, Parechovirus, virus de Epstein-Barr y virus de la Varicela-Zoster.
- Hongos: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Aunque los datos recogidos hasta ahora sobre el uso de este panel reflejan buenos resultados (diagnóstico más precoz, mayor sensibilidad y mayor especificidad), no es posible aún dejar de realizar las pruebas rutinarias⁴⁵. El cultivo y la tinción de Gram se siguen realizando para detectar microorganismos no incluidos en el panel y para la realización de pruebas de sensibilidad a antibióticos. Por otro lado, la detección del antígeno criptocócico se sigue realizando para el diagnóstico de meningitis por *Cryptococcus* como método de referencia. Aun cuando el panel es negativo, si se tiene alta sospecha de meningitis bacteriana o encefalitis es necesario incluir tratamiento empírico^{7,46}.

3.5. Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) están asociadas a una elevada morbilidad y mortalidad, comprometen la salud sexual y reproductiva y facilitan la aparición de otras enfermedades⁴⁷. La aparición de tratamientos antirretrovirales para el VIH hizo que la población abandonase el uso de preservativos como método para prevenirlo. Además del VIH, el preservativo previene la infección de otras múltiples enfermedades infecciosas, por lo que su uso aún sigue siendo necesario. El desuso ha ocasionado un gran incremento en la incidencia de las ITS. Las poblaciones más susceptibles son los hombres que practican sexo con hombres, la prostitución (tanto masculina, como femenina) y los heterosexuales que mantienen relaciones sexuales con múltiples parejas.

El diagnóstico precoz de estas infecciones, además de evitar el avance de la enfermedad en el propio paciente afectado, también permitiría la prevención de la transmisión y diseminación de la infección de forma rápida, por lo que el diagnóstico se realiza con estos dos fines. Entre las técnicas clásicas de diagnóstico, muchas de las cuales todavía se usan, se incluyen la tinción de Gram del exudado uretral (para la uretritis gonocócica), del exudado vaginal (para la vaginosis bacteriana), el examen en fresco del exudado vaginal (para el diagnóstico de infección por *Trichomonas vaginalis* o *Candida spp.*) o la microscopía en campo oscuro (para la sífilis primaria), entre otros⁴⁷. El diagnóstico por medios microbiológicos es complejo, debido a que muchos de los microorganismos causantes requieren condiciones muy especiales para el cultivo, algunos no son cultivables (como es el caso de *Treponema pallidum*), otros son muy sensibles a las condiciones ambientales y producen falsos negativos (*Neisseria gonorrhoeae*)... Además también se siguen utilizando muchas pruebas serológicas⁴⁸.

En los últimos años, se han abierto paso las nuevas técnicas basadas en la biología molecular, en concreto en la reacción en cadena de la polimerasa. A partir de muestras genitourinarias (orina, exudado uretral y exudado cervical) se ha conseguido extraer ADN de los microorganismos responsables de la patología y esto supone una de las grandes ventajas de estas técnicas, el uso de muestras no invasivas, además de la posibilidad de detectar patógenos de difícil cultivo o genes de resistencia. La alta sensibilidad ha hecho que se mejoren los programas de cribado y se tenga un mayor control de la población afectada⁴⁸. Según las recomendaciones del Centro de Control de Enfermedades (CDC) la muestra óptima en la mujer es el exudado vaginal y en el hombre es la orina.

Entre las técnicas que se pueden usar se encuentran la PCR convencional, la PCR a tiempo real, la PCR múltiple, la LAMP y la detección múltiple mediante *microarrays*. Se emplean estas técnicas en el diagnóstico de infecciones producidas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*, *Gardnerella vaginalis* y *Lactobacillus*, *Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, virus del herpes simple 1 y 2, entre otros). Actualmente existen diferentes paneles, que pueden detectar la presencia de siete o más patógenos⁵.

Clamidias

C. trachomatis es la bacteria más frecuente responsable de estas infecciones. Afecta principalmente a jóvenes y en muchos casos lo hace de forma asintomática, llegando a producir grandes complicaciones sin haber alcanzado un diagnóstico previo. El primer sistema basado en la detección de ácidos nucleicos para la detección de *C. trachomatis* se desarrolló en 1993, y desde entonces se han ido desarrollando sistemas que aportan diferentes mejoras en el proceso de identificación del microorganismo. Entre ellas, la posibilidad de detección conjunta de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*, ya que se trata de dos microorganismos que producen coinfecciones en más del 50% de los jóvenes⁴⁹.

Gonococia

La detección de *Neisseria* mediante métodos moleculares es más sensible que el cultivo y se puede usar diferentes muestras para su detección, entre ellas muestras uretrales, orina, muestra endocervical o vaginal. La muestra de orina en la mujer es mucho menos sensible y no se considera adecuada para el diagnóstico⁴⁷. En el caso de *N. gonorrhoeae* cabe destacar el desarrollo de genes de resistencia al tratamiento antimicrobiano y las ventajas que la biología molecular aporta a este hecho. Con estas técnicas se están desarrollando métodos de detección de resistencia a penicilina, a ciprofloxacino, a azitromicina y a otros antibióticos⁴⁸.

Sífilis

Para el diagnóstico de la sífilis (producida por *Treponema pallidum*) hasta ahora se han utilizado técnicas como la microscopía de campo oscuro y la inmunofluorescencia directa, que se consideran métodos de baja sensibilidad y han

dado pie el desarrollo de nuevas técnicas, basadas en la biología molecular. Las nuevas técnicas para el diagnóstico amplifican el ADN del microorganismo mediante PCR y utilizan como diana distintos genes que codifican lipoproteínas (*bmp*, *tpp47*, *tmpA* o 4D)⁴⁸. Otros genes utilizados en el diagnóstico de la sífilis son el gen *poIA*, *TpN47* y el gen *16S ARNr*, que tiene un gran número de copias por célula⁵⁰. Se pueden emplear diferentes muestras biológicas para su diagnóstico mediante métodos moleculares, como son muestras orales y muestras extragenitales y genitales⁴⁷.

Virus del herpes simplex

El virus del herpes simplex 1 está asociado principalmente a infecciones orolabiales, mientras que el tipo 2 está más asociado a infecciones genitales. Las técnicas moleculares han permitido mejorar en gran medida la sensibilidad con respecto al cultivo. Para el diagnóstico de ambos virus se puede utilizar la PCR en tiempo real teniendo como dianas secuencias conservadas de genes que codifican proteínas para la ADN polimerasa y timidina-cinasa (comunes a VHS-1 y VHS-2) o glucoproteínas de superficie (gG, gD y gI), que ayudan a su identificación⁴⁸.

Tricomoniasis

En el diagnóstico de la tricomoniasis (producida por *Trichomonas vaginalis*) se pueden utilizar diferentes técnicas: PCR convencional, PCR en tiempo real, PCR isotérmica dependiente de la helicasa, PCR múltiple, RAPD y MLST, entre otras. Con esta última técnica, se pueden analizar los diferentes genotipos y aunque no parecía haber relación entre el genotipo y el sexo y la edad, se ha encontrado que el genotipo II posiblemente circula en redes sexuales de alto riesgo⁵¹. El sistema BD Affirm VP III permite detectar la presencia de *Trichomonas vaginalis* con una sensibilidad del 89,2% y especificidad que ronda el 100%⁴⁷.

Virus del papiloma humano

Otra de las enfermedades más frecuentes de transmisión sexual es el virus del papiloma humano, cuya gravedad puede variar desde ser asintomático hasta producir cáncer de cuello de útero, vagina, ano, pene y cáncer orofaríngeo, por lo que la necesidad de establecer de forma precoz el diagnóstico es fundamental para evitar la progresión de la infección. Se han desarrollado diversos ensayos basados en la amplificación del DNA o amplificación mediante sondas y de todos ellos, hay 5 aprobados por la FDA: Hybrid Capture 2[®] de Digene, Cervista HPV HR[®] y Cervista HPV16/18[®] de Hologic, que se basan en amplificación de la señal; Cobas HPV Test[®] de Roche Diagnostics y Aptima HPV Assay[®] de Hologic, basados en amplificación de la diana, y Aptima HPV, basada en la detección de ARNm de E6/E7 (48). El virus del papiloma humano tiene diferentes genotipos, considerados de bajo o alto riesgo en función de las complicaciones que pueden ir asociadas a la infección. Se recomienda utilizar aquellos sistemas que sean capaces de diferenciar entre los genotipos, al menos 16 y 18 que son los mayormente asociados a neoplasias⁹.

Vaginosis

Para el diagnóstico de las vaginosis producidas por *Gardnerella vaginalis* se han desarrollado técnicas de biología molecular basadas en el uso de sondas de ADN. Además de detectar *G. vaginalis* pueden detectar *Trichomonas vaginalis* y *Candida spp.* El sistema BD Affirm VP III de Beckton Dickinson permite detectar mediante una sonda de ADN elevadas concentraciones de *Gardnerella vaginalis*⁴⁷, pero hay más sistemas aún no disponibles en los laboratorios, que están realizando estudios de PCR múltiple y que permitirán detectar tanto microorganismos con papel patogénico como protector implicados en las vaginosis⁴⁸.

Candidiasis

Entre las enfermedades de transmisión sexual también están las producidas por hongos como es el caso de *Candida spp.*, para la cual también existen métodos de identificación basados en la biología molecular (entre otros el que se comenta en el apartado anterior, que podría determinar de forma conjunta la presencia de varios microorganismos)⁴⁸.

Virus de la inmunodeficiencia humana

Dentro de este grupo de enfermedades, ocupa un lugar importante el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Algunas de las enfermedades comentadas anteriormente y sobre todo aquellas que producen úlceras (entre ellas la sífilis o el herpes genital) favorecen la infección y transmisión del VIH. Para el diagnóstico y la monitorización del VIH se utilizan diversas técnicas basadas en la realización de una PCR a tiempo real, técnica que se caracteriza por tener sensibilidad, reproducibilidad y linealidad elevada⁵². El primer paso de estas técnicas consiste en la extracción de ARN, seguido de la retrotranscripción del ARN a ADNc y la posterior amplificación. Sobre el producto amplificado se unen moléculas con fluorescencia que producen una señal y que van a permitir la cuantificación.

Además, mediante estas técnicas moleculares se puede obtener el genotipo del virus y poder determinar la resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales. Para ello, se puede utilizar la secuenciación tipo Sanger (secuenciación unidireccional) o secuenciación bidireccional. La secuencia que se obtiene del virus que ha infectado al paciente se compara

con una secuencia de referencia del VIH y se valora la presencia o no de mutaciones. Estas mutaciones podrían conferirle al virus resistencia a los fármacos. La secuenciación Sanger ha permitido conocer modos de transmisión del VIH, epidemiología del VIH, el subtipado molecular utilizando la secuencia del gen pol y las redes migratorias de los diferentes subtipos^{53,54}.

Además, se puede utilizar la PCR digital, que permite cuantificar las moléculas pertenecientes al virus. Esta técnica permite detectar mutaciones presentes en el virus y que están asociadas a fenotipos más graves de infección como el cáncer.⁵⁵

3.6. Enfermedades fúngicas invasoras

Las enfermedades fúngicas invasoras son patologías de gran importancia clínica, tanto por la gran mortalidad como por el aumento del número de pacientes en riesgo (principalmente pacientes con patologías hematológicas, pacientes trasplantados o pacientes en cuidados críticos). El tiempo hasta que se produce el diagnóstico es un factor que contribuye al aumento de la mortalidad producida por este tipo de microorganismos, por lo que un diagnóstico rápido permitiría mejorar el pronóstico de las infecciones producidas por hongos.

Fundamentalmente están causadas por diferentes especies del género *Candida* y *Cryptococcus* (principalmente en pacientes africanos coinfectados por VIH) aunque cada vez son más frecuentes los casos de aspergilosis (principalmente producidos por *Aspergillus fumigatus*), sobre todo en pacientes con patología pulmonar o ingresados en cuidados intensivos. El diagnóstico, hasta ahora, se basaba en cultivo microbiológico, pero con los nuevos avances, se han desarrollado técnicas para la identificación de estos microorganismos, como son la detección de biomarcadores circulantes y el ADN fúngico.

El diagnóstico de las infecciones fúngicas invasoras basado en la detección del ADN fúngico supone un elevado coste y la necesidad de personal cualificado. Además, se pueden encontrar problemas de extracción del ADN de las muestras y problemas de estandarización y no únicamente problemas de amplificación o relacionados con la técnica. A pesar de ello, la PCR es una buena alternativa en

Tabla 5. Técnicas utilizadas para el diagnóstico de infecciones de transmisión sexual (diferentes métodos y microorganismos). Adaptada de (56).

Técnicas diagnósticas de ITS según agente etiológico

Grupo técnicas diagnósticas	Agente etiológico											
	NG	CT	LGV	<i>Mycoplasma sp^a</i>	TV	TP	<i>H. ducreyi</i>	VIH/hepatitis	VHS	VPH	EP	PZ
Microscopía	Si (L. Gram; ex. uretral, rectal)	Si ^b	N/A	N/A	Si (examen fresco; ex.vaginal)	Si (campo oscuro; úlceras genitales)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Si
Cultivo	Si (medios selectivos)	N/A	N/A	N/A	Si	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Si	N/A
Técnicas de biología molecular	Si	Si	Si	Si	Si	Si (úlceras genitales) ^c	Si (úlceras genitales)	Si (carga viral)	Si	Si	N/A	N/A
Serología	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Si	N/A	Si	N/A	N/A	N/A	N/A

CT: *Chlamydia trachomatis*; EP: bacterias enteropatógenas; LGV: linfogranuloma venéreo; N/A: no aplica; NG: *Neisseria gonorrhoeae*; PZ: protozoos intestinales; TP: *Treponema pallidum*; TV: *Trichomonas vaginalis*; VHS: virus herpes simple 1 y 2; VPH: virus del papiloma humano.

^a Comprende los agentes etiológicos *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*.

^b El estudio microscópico de un sedimento de orina o una tinción de Gram de un exudado uretral poniendo de manifiesto una uretritis (>5 leucocitos/campo) podría orientar a una posible uretritis no gonocócica. También la tinción de Gram de un exudado rectal para evaluar una posible proctitis (>5 leucocitos/campo) sería de utilidad.

^c El rendimiento de las técnicas de amplificación genética para detectar *Treponema pallidum* en sangre o líquido cefalorraquídeo es muy bajo.

el diagnóstico de infecciones fúngicas. Esta técnica aporta sensibilidad y especificidad suficiente para identificar este microorganismo en muestras clínicas⁵⁷.

Para el diagnóstico de algunas especies de hongos pueden utilizarse los sistemas Septifast de Roche®, Magicplex Sepsis Real Time, SeptiTest y VYOO. La mayoría de estos sistemas (ya comentados previamente en el diagnóstico de pacientes sépticos) utilizan para la identificación de hongos las secuencias entre el 18S y el 5,8 S. Con estos sistemas pueden identificarse 5 especies diferentes de *Candida* spp. y *Aspergillus fumigatus* en un periodo de tiempo que varía de un sistema a otro pero que ronda las 5-8 horas²³.

Otros sistemas que pueden emplearse, aunque estos son más concretos y van dirigidos a especies concretas de hongos son: MycAssay Aspergillus (que permite identificar hasta 15 especies diferentes del género *Aspergillus*, entre ellas *A. fumigatus*)⁵⁷ y MycAssay Pneumocystis (capaz de identificar *Pneumocystis jirovecii*, patógeno capaz de producir neumonía de forma frecuente en pacientes con VIH o inmunodeprimidos)⁵⁸.

En el caso de *Aspergillus*, el ensayo comercial para su identificación más utilizado es el MycAssay, útil para muestras de suero/plasma, tejido y lavado broncoalveolar, siendo esta última la muestra con mejores resultados de sensibilidad y especificidad⁵⁷.

Lewis White et al. comparan resultados de PCR en plasma y suero y obtienen resultados mucho más sensibles en plasma (94,7%) que en suero (68,4%)⁵⁹. La utilización del PCR cuantitativa mediante Light Cycler también permite a partir de las curvas de melting establecer el diagnóstico entre diferentes especies⁶⁰.

Además de la PCR convencional, en el diagnóstico de estos microorganismos se pueden utilizar otras técnicas como qPCR, LAMP, FISH o secuenciación del DNA (donde hay recogida en bases de datos información de hasta 5000 especies fúngicas) y una técnica llamada Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridation (PNA-FISH)⁶¹. Esta última se ha visto que aporta buenos resultados de sensibilidad y especificidad y permite identificar diferentes especies hongos. Los PNA son estructuras artificiales de poliamidas resistentes a la degradación por nucleasas y proteasas que se unen de forma compleja y estable a ADN o ARN complementario. Los PNA se marcan con fluorescencia y 2,5 horas después se puede identificar al microorganismo causante de la infección a través de un microscopio de fluorescencia^{38,62}.

Las técnicas moleculares permiten tanto identificar como realizar estudios de sensibilidad a tratamientos farmacológicos de los hongos causantes de infecciones, otra de las principales causas de mortalidad asociadas a este tipo de microorganismos⁵⁷.

3.7. Enfermedades producidas por parásitos

El diagnóstico rápido de una infección por parásitos puede jugar un papel crucial en el tratamiento y el pronóstico del paciente, sobre todo en aquellos casos en los que la patología es grave y tiene asociada una alta mortalidad, como la malaria. El diagnóstico tradicional de la infección parasitaria

se ha realizado mediante observación al microscopio. A día de hoy, esto sigue siendo fundamental, pero se han abierto paso las técnicas basadas en la biología molecular en el diagnóstico de enfermedades parasitarias por su elevada sensibilidad y especificidad.

A la hora de realizar estas técnicas moleculares es necesario tener en cuenta que hay muchos factores que dificultan el proceso, entre ellos:

- El proceso de extracción del ADN puede no ser fácil en algunos de los casos, especialmente en aquellos en los que la infección está producida por larvas con características físicas que las hacen resistentes a la rotura (por ejemplo larvas de *Strongyloides* spp.).
- Las muestras de heces normalmente utilizadas contienen gran cantidad de restos que pueden inhibir el proceso de amplificación del ADN.
- La eliminación de parásitos en las muestras es escasa e intermitente, por lo que se pueden obtener resultados falsos negativos⁶³.

La PCR en tiempo real asociada al análisis de alta resolución de fusión (High Resolution Melting-HRM) es una técnica basada en las diferencias en los nucleótidos del fragmento amplificado, que dará lugar a una temperatura de fusión diferente según la secuencia. Esta técnica se emplea en la detección y determinación del genotipo del parásito y de genes responsables de resistencia al tratamiento farmacológico⁶⁴. Con la PCR digital se pueden identificar en diferentes tipos de muestras infecciones producidas por diferentes parásitos, entre ellos: *Ascaris lumbricoides*, *Cryptosporidium* o *Schistosoma*, entre otros⁶⁵.

Malaria

La malaria puede ser producida por diferentes especies del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale wallikeri* y *P. ovale curtisi*). De todas ellas, la más grave y que causa una alta mortalidad es la producida por *P. falciparum*. Las técnicas básicas del diagnóstico son la gota gruesa y la extensión final de sangre con tinción de Giemsa. Pero en este proceso diagnóstico también son importantes las técnicas moleculares (PCR convencional multiplex y PCR en tiempo real). La PCR multiplex es la técnica más sensible y permite confirmar cual es la especie de *Plasmodium* responsable de la infección. Además, permite diagnosticar malarías que no podrían detectarse al microscopio, infecciones mixta y permite diferenciar la infección de *P. knowlesi* de *P. falciparum* (que morfológicamente son muy parecidas)⁶⁶. Además de la PCR se han probado diferentes kits comerciales para el diagnóstico de la malaria mediante FISH. Los diferentes ensayos son capaces de detectar al parásito en todos sus estadios, incluyendo el gametocito, a partir de una muestra de sangre total del paciente, sin previa extracción de ADN y en un tiempo aproximado de una hora. Esta técnica únicamente permite obtener información de los parásitos que se encuentran vivos en la muestra⁶⁷. La técnica más reciente es la PCR digital y esta es extremadamente sensible, capaz de detectar parasitemias muy bajas de *Plasmodium*⁶⁵.

Toxoplasmosis

La infección por *Toxoplasma gondii* en el embarazo puede dar lugar a complicaciones graves como muerte intrauterina, hidrocefalia o retraso mental. Ante una sospecha de infección en la embarazada es necesario realizar estudios para confirmar el diagnóstico, para ello, además de las técnicas serológicas es necesario realizar un estudio basado en técnicas moleculares (PCR o PCR en tiempo real). Este análisis puede realizarse en la placenta, en sangre de cordón o en sangre del recién nacido en caso de haber finalizado la gestación⁶⁸.

Leishmaniasis

La leishmaniasis es otra enfermedad producida por parásitos del género *Leishmania* y que puede tener diferentes cuadros clínicos (leishmaniosis visceral, cutánea y mucocutánea). Existen más de 20 especies de *Leishmania* que pueden ser responsables de la infección. El diagnóstico de rutina se basa en la observación al microscopio, pero la sensibilidad es baja. En cambio, las técnicas moleculares aportan alta sensibilidad y especificidad y se basan en la realización de PCR y PCR a tiempo real⁶⁹.

Enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi es el parásito responsable de la enfermedad de Chagas. Las técnicas moleculares son importantes, especialmente, en el diagnóstico de mujeres embarazadas para evitar la transmisión al feto y en pacientes con otras infecciones como el VIH. La PCR, PCR a tiempo real y LAMP son tres de las técnicas que permiten detectar al parásito en muestras de sangre de pacientes con elevada sensibilidad y especificidad, así como el seguimiento de la enfermedad en respuesta al tratamiento farmacológico⁷⁰. En este caso, la PCR digital no ofrece ninguna ventaja adicional sobre la PCR en tiempo real⁶⁵.

3.8. Enfermedades producidas por micobacterias

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, que incluyen múltiples especies causantes de patologías con alta morbilidad y mortalidad, entre ellas, la tuberculosis (producida por *Mycobacterium tuberculosis*) y la lepra (producida por *Mycobacterium leprae*). Además, existe el complejo de micobacterias no tuberculosas (MNT), que pueden ser oportunistas o saprófitas (se han relacionado con infecciones pulmonares, dermatológicas e infecciones más severas en pacientes inmunodeprimidos) y que se ha visto que presentan una mayor resistencia a los antimicrobianos convencionales.

Para el diagnóstico de la tuberculosis se pueden utilizar muestras pulmonares, como el esputo, y extrapulmonares, como la orina y el líquido cefalorraquídeo. En el caso de este último, es importante que el recipiente utilizado para su recolección no contenga heparina, que el líquido no sea hemático o xantocrómico, pues la heparina, la hemoglobina y la bilirrubina son inhibidores de la PCR y favorecerían la aparición de resultados falsos negativos⁷¹.

Además de las formas clásicas de identificación de estos microorganismos, se han desarrollado nuevas técnicas ba-

sadas en la amplificación de ácidos nucleicos. Estas se consideran actualmente un complemento a las técnicas convencionales (baciloscopia y cultivo) y pueden utilizarse tanto para la identificación como para la determinación de resistencias a antimicrobianos.

El método Xpert MTB/RIF es un método molecular basado en PCR a tiempo real que permite la detección de tuberculosis y la resistencia de la micobacteria a la rifampicina en menos de 2 horas, utilizando un cartucho de plástico desechable que contiene en su interior los reactivos necesarios para la lisis de la micobacteria, la extracción de ADN, la amplificación de los genes *diana* y la detección de los resultados para su posterior interpretación⁷². Se ha detectado cierta falta de sensibilidad en el caso de determinar resistencia a la rifampicina y esto ha hecho que se desarrollen nuevos métodos, entre ellos el Xpert MTB/RIF ultra. Este nuevo sistema, amplifica otras regiones diferentes y tiene una sensibilidad mucho mayor, pudiendo detectar 16 UFC/ml (114 UFC/ml en el método Xpert MTB/RIF). A pesar de las mejoras en la sensibilidad, un estudio que compara ambos sistemas obtiene como resultados una mejora en la sensibilidad a expensas de una ligera disminución de la especificidad. La técnica ultra resulta importante en la detección de tuberculosis en pacientes infectados además por VIH, en pacientes pediátricos o en pacientes con tuberculosis extrapulmonar⁷³.

Los métodos moleculares utilizados hasta ahora no permiten la cuantificación del patógeno. Para el seguimiento y monitorización del paciente se recomienda el uso de métodos que permitan cuantificar la carga bacteriana del agente patógeno, es por ello, por lo que se han realizado pruebas basadas en PCR digital, que permitirían la cuantificación⁷⁴.

4. CONCLUSIONES

Las enfermedades infecciosas son una causa muy frecuente de patología en la sociedad. La gran cantidad de agentes patógenos capaces de producir infección hace que el diagnóstico sea complicado, la clínica que producen muchos microorganismos es común y por eso, se necesitan técnicas diagnósticas para la identificación del agente infeccioso.

Las técnicas tradicionales basadas principalmente en el cultivo o en la detección de antígenos requieren en la mayoría de los casos condiciones específicas y mucho tiempo para llegar a la identificación del microorganismo. Una de las alternativas que cumple con las características de proceso de identificación ideal es la biología molecular: proceso rápido, sensible y específico, utilizando un volumen de muestra pequeño, sin condiciones especiales de extracción, transporte y conservación... Estas técnicas están en continuo desarrollo, lo que permite disminuir sus desventajas y mejorar su uso.

Entre las técnicas diagnósticas destacan la PCR en tiempo real o cuantitativa, la RT-PCR, los *microarrays* y la secuenciación. Estas técnicas permiten abordar el proceso diagnóstico de diferentes maneras, dirigido a un único agente patógeno o mediante la utilización de paneles

que permitirían identificar múltiples microorganismos de una sola vez. Destacan los paneles de sepsis, de patologías gastrointestinales, respiratorios o de afectación del sistema nervioso central, que además de permitir la detección de múltiples patógenos (virus, bacterias, hongos y parásitos), tienen un tiempo de respuesta rápido y dan información sobre posibles resistencias a antibióticos.

Las técnicas de biología molecular permiten alcanzar un diagnóstico rápido y definitivo, que permitiría mejorar el pronóstico de muchas de las enfermedades infecciosas, utilizar tratamientos antibióticos adecuados teniendo en cuenta si el microorganismo responsable presenta o no resistencia a algún tratamiento antimicrobiano, o evitar la diseminación de la infección.

La utilización de paneles presenta menor sensibilidad que aquellas técnicas dirigidas en concreto hacia un agente patógeno, pero suponen un coste inferior y menor tiempo para alcanzar el diagnóstico que técnicas dirigidas a un único patógeno cuando la clínica del paciente no orienta hacia un microorganismo en concreto.

REFERENCIAS

1. E. BH. Nuevas Tecnologías En Diagnóstico Microbiológico: Automatización Y Algunas Aplicaciones En Identificación Microbiana Y Estudio De Susceptibilidad. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2015; 26(6): 753–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.004>
2. Guna Serrano MR, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M, Rodríguez Díaz JC. Microbiological diagnosis of bacteraemia and fungaemia: Blood cultures and molecular methods. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2019; 37(5): 335–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.005>
3. J. Farfán BM. Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2015; 26(6): 788–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.007>
4. Cantón R, Loza E, Romero J. Aplicabilidad de las nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico; innovación tecnológica. *Rev Esp Quimioter.* 2015; 28: 5–7.
5. Vila J, Dolores M, Salavert M, Bosch J. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. 2017; 35(1): 41–6.
6. Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, Kaushik KS, Salehi B, Bevilacqua A, et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms.* 2019; 7(5).
7. Hanson KE, Couturier MR. Multiplexed Molecular Diagnostics for Respiratory, Gastrointestinal, and Central Nervous System Infections. *Clin Infect Dis.* 2016; 63(10): 1361–7.
8. Mullegama S V., Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V, et al. Nucleic acid extraction from human biological samples. In: *Methods in Molecular Biology.* 2019.
9. Gomez de la Torre JC. Diagnostico molecular de enfermedades infecciosas. 2016.
10. Ríos-Sánchez E, Calleros E, González-Zamora A, Rubio J, Martínez O, Martínez A, et al. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Univ.* 2016.
11. Huertas C, Urbano E, Torres M. Diagnostico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Rev haban cienc méd.* 2019; 18(3): 513–28.
12. Angarita M, Torres M, Díaz A. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev Habanera Ciencias Medicas.* 2017; 16(5): 796–807.
13. Zemtsova GE, Montgomery M, Levin ML. Relative sensitivity of conventional and real-time PCR assays for detection of SFG Rickettsia in blood and tissue samples from laboratory animals. *PLoS One.* 2015.
14. Goudarzi H, Mirsamadi ES, Ghalavand Z, Hakemi Vala M, Mirjalali H, Hashemi A. Rapid detection and molecular survey of blaVIM, blaIMP and blaNDM genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new multiplex real-time PCR and melting curve analysis. *BMC Microbiol.* 2019; 19(1): 1–7.
15. Cuylaerts V, De Baetselier I, Muvunyi CM, Mwambange L, Smet H, Rusine J, et al. Implementation and evaluation of the Presto combined qualitative real-time assay for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Rwanda. *Afr J Lab Med.* 2019.
16. Camporiondo MP, Farchi F, Ciccozzi M, Denaro A, Gallone D, Maracchioni F, et al. Detection of HPV and co-infecting pathogens in healthy Italian women by multiplex real-time PCR. *Infez Med.* 2016; 24(1): 12–7.
17. Choe W, Kim E, Park SY, Chae JD. Performance Evaluation of Anyplex plus MTB/NTM and AdvanSure TB/NTM for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous *Mycobacteria*. *Ann Clin Microbiol.* 2015; 18(2): 44.
18. Idrees F, Irfan M, Jabeen K, Farooqi J, Hasan R. Diagnostic performance of genoType® MTBDRplus line probe assay in bronchoalveolar lavage for pulmonary tuberculosis diagnosis in sputum scarce and smear-negative patients. *Int J Mycobacteriology.* 2017.
19. Afzal M, Manzoor I, Kuipers OP. A fast and reliable pipeline for bacterial transcriptome analysis case study: Serine-dependent gene regulation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Vis Exp.* 2015.
20. Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, Manzano-Agugliario F. DNA sequencing sensors: An overview. *Sensors (Switzerland).* 2017; 7(3): 1–15.
21. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(6): 333–51.

22. Lukumbuzya M, Schmid M, Pjevac P, Daims H. A multi-color fluorescence in situ hybridization approach using an extended set of fluorophores to visualize microorganisms. *Front Microbiol.* 2019; 10(JUN): 1–13.
23. Marco F. Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35(9): 586–92.
24. Corvalán L. P, Arias B. G, Morales S. P, González M. R, Inostroza S. J, Fuenzalida I. L. Inmunofluorescencia indirecta versus reacción de polimerasa en cadena para el diagnóstico de virus respiratorios en niños ingresados en un hospital de la Región Metropolitana. *Rev Chil infectología.* 2019; 36(1): 26–31.
25. Esposito S, Mencacci A, Cenci E, Camilloni B, Silvestri E, Principi N. Multiplex platforms for the identification of respiratory pathogens: Are they useful in pediatric clinical practice? *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9(JUN).
26. Thorburn F, Bennett S, Modha S, Murdoch D, Gunson R, Murcia PR. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections. *J Clin Virol [Internet].* 2015; 69: 96–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.082>
27. Parker J, Chen J. Application of next generation sequencing for the detection of human viral pathogens in clinical specimens. *J Clin Virol.* 2017.
28. Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Rojo Rello S, Sanz Muñoz I. Retos diagnósticos de la gripe. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019.
29. Douthwaite ST, Walker C, Adams EJ, Mak C, Ortiz AV, Martinez-Alier N, et al. Performance of a novel point-of-care molecular assay for detection of influenza A and B viruses and respiratory syncytial virus (enigma minilab) in children with acute respiratory infection. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(1): 212–5.
30. Huzly D, Korn K, Bierbaum S, Eberle B, Falcone V, Knöll A, et al. Influenza A virus drift variants reduced the detection sensitivity of a commercial multiplex nucleic acid amplification assay in the season 2014/15. *Arch Virol.* 2016.
31. Gadsby NJ, Russell CD, Mchugh MP, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, et al. Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(7): 817–23.
32. Martini H, Detemmerman L, Soetens O, Yusuf E, Piérard D. Improving specificity of Bordetella pertussis detection using a four target real-time PCR. *PLoS One.* 2017; 12(4): 1–11.
33. Dou M, Macias N, Shen F, Dien Bard J, Domínguez DC, Li XJ. Rapid and Accurate Diagnosis of the Respiratory Disease Pertussis on a Point-of-Care Biochip. *EClinical-Medicine.* 2019; 8: 72–7.
34. Balsalobre-Arenas L, Alarcón-Cavero T. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35(6): 367–76.
35. Beal SG, Tremblay EE, Toffel S, Velez L, Rand KH. A gastrointestinal PCR panel improves clinical management and lowers health care costs. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(1): 1–9.
36. Malik YS, Verma AK, Kumar N, Touil N, Karthik K, Tiwari R, et al. Advances in Diagnostic Approaches for Viral Etiologies of Diarrhea: From the Lab to the Field. *Front Microbiol.* 2019; 10(September): 1–18.
37. Freeman K, Mistry H, Tsertsvadze A, Royle P, McCarthy N, Taylor-Phillips S, et al. Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: A systematic review and economic analysis. *Health Technology Assessment.* 2017.
38. Sante L, Pedroso Y, Castro B, Lecuona M. Is there a relationship between the polimerase chain reaction cycle threshold and the risk of severe Clostridium difficile infection? *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet].* 2018; 36(9): 600–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.11.015>
39. Rand KH, Tremblay EE, Hoidal M, Fisher LB, Grau KR, Karst SM. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: Implications for infection control. *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet].* 2015; 82(2): 154–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.007>
40. Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, Raoult D. The point-of-care laboratory in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(3): 429–47.
41. Universal S, Electrophoresis SG. crossm Rapid and Simple Universal Escherichia coli Genotyping Repeat Analysis Using Single-Tube Multiplex PCR and. 2019; 85(6): 1–15.
42. Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(1): 3–31.
43. Pohl D, Keller PM, Bordier V, Wagner K. Review of current diagnostic methods and advances in Helicobacter pylori diagnostics in the era of next generation sequencing. *World Journal of Gastroenterology.* 2019.
44. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SSW, et al. Diagnosis of helicobacter pylori infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(40): 11221–35.
45. López-Amor L, Escudero D, Fernández J, Martín-Iglesias L, Viña L, Fernández-Suárez J, et al. Diagnóstico de meningitis/encefalitis en UCI con sistema de PCR múltiple. ¿Es tiempo de cambio? *Rev Esp Quimioter.* 2019; 32(3): 246–53.
46. Hanson KE, Slechta ES, Killpack JA, Heyrend C, Lunt T, Daly JA, et al. Preclinical Assessment of a Fully Automated Multiplex PCR Panel for. 2016; 54(3): 785–7.

47. Otero-guerra L, Fernández-blázquez A. Diagnóstico rápido de las infecciones de transmisión sexual. 2017; 35(7): 444–50.
48. Sabater Cabrera C, Rodríguez Pérez M, Vázquez F, Otero Guerra L. Detección de infecciones de transmisión sexual por técnicas de biología molecular. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2017; 35: 58–63. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-infecciones-transmision-sexual-por-X0213005X17617225> ER
49. Galán JC, Rodríguez-Domínguez M. Mejora del diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en la era molecular, una oportunidad para los sistemas de vigilancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015.
50. Pinilla G, Campos L, Durán A, Navarrete J, Muñoz L. Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. *Biomedica*. 2018.
51. Van Der Veer C, Himschoot M, Bruisten SM. Multilocus sequence typing of *Trichomonas vaginalis* clinical samples from Amsterdam, the Netherlands. *BMJ Open*. 2016; 6(10): 1–8.
52. Yamazaki S, Kondo M, Sudo K, Ueda T, Fujiwara H, Hasegawa N, et al. Qualitative real-time PCR assay for HIV-1 and HIV-2 RNA. *Jpn J Infect Dis*. 2016; 69(5): 367–72.
53. Chahal G, Tyagi S, Ramialison M. Navigating the non-coding genome in heart development and Congenital Heart Disease. *Differentiation* [Internet]. 2019;107(October 2018): 11–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.05.001>
54. Fernández-Caballero Rico JÁ, Chueca Porcuna N, Álvarez Estévez M, Mosquera Gutiérrez M del M, Marcos Maeso MÁ, García F. Validación de un método seguro y sencillo para la elaboración de secuencias consenso del virus de la inmunodeficiencia humana a partir de los datos de secuenciación masiva 454. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018.
55. Anderson EM, Maldarelli F. Quantification of HIV DNA Using Droplet Digital PCR Techniques. *Curr Protoc Microbiol*. 2018.
56. del Romero J, García-Pérez JN, Espasa-Soley M. Prevención y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual en personas con alto riesgo, incluyendo pacientes infectados por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019.
57. Barnes RA, Lewis White P. PCR technology for detection of invasive aspergillosis. *J Fungi*. 2016; 2(3): 1–9.
58. Sasso M, Chastang-Dumas E, Bastide S, Alonso S, Lechiche C, Bourgeois N, et al. Performances of Four Real-Time PCR Assays for Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2016.
59. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical performance of aspergillus PCR for testing serum and plasma: A study by the European aspergillus PCR initiative. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(9): 2832–7.
60. Barnes RA, White PL, Morton CO, Rogers TR, Cruciani M, Loeffler J, et al. Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips. *Med Mycol*. 2018; 56: S60–72.
61. Da Silva RM, Da Silva Neto JR, Santos CS, Frickmann H, Poppert S, Cruz KS, et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015; 14(1): 1–6.
62. Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun*. 2018; 9(1).
63. Fernández-Rivas G, Rivaya B, Romaní N, Hao Wang J, Alcaide M, Matas L. Diagnosis of soil-transmitted helminth infections. An unsolved problem in the omics era. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2019; 37(Supl 1): 20–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30178-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30178-8)
64. Mohammad Rahimi H, Pourhosseingholi MA, Yadegar A, Mirjalali H, Zali MR. High-resolution melt curve analysis: A real-time based multipurpose approach for diagnosis and epidemiological investigations of parasitic infections. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019; 67(September): 101364. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101364>
65. Pomari E, Piubelli C, Perandin F, Bisoffi Z. Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019.
66. Rojo-Marcos G, Cuadros-González J. Malaria y protozoos intestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34(3): 191–204.
67. Shah J, Mark O, Weltman H, Barcelo N, Lo W, Wronska D, et al. Fluorescence In Situ hybridization (FISH) assays for diagnosing malaria in endemic areas. *PLoS One*. 2015; 10(9): 1–15.
68. Ángela Carral L, Kaufer F, Pardini L, Durlach R, Moré G, Venturini MC, et al. Congenital toxoplasmosis: Serology, PCR, parasite isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* [Toxoplasmosis congénita: Diagnóstico serológico, RPC, aislamiento y caracterización molecular de *Toxoplasma gondii*]. *Rev Chil Infectol*. 2018.
69. León CM, Muñoz M, Hernández C, Ayala MS, Flórez C, Teherán A, et al. Analytical performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six *Leishmania* species DNA in Colombia. *Front Microbiol*. 2017.
70. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2018.

71. Chin JH, Ssengooba W, Grossman S, Pellinen J, Wadda V. Xpert MTB/RIF Ultra: Optimal procedures for the detection of Mycobacterium tuberculosis in cerebrospinal fluid. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2019; 14(August 2018): 16–8.
72. Alemu A, Amare M, Ameni G, Kebede A, Beyene D, Yewnew B, et al. Monitoring quality indicators for the Xpert MTB/RIF molecular assay in Ethiopia. *PLoS One*. 2019; 14(11): 1–13.
73. Piersimoni C, Gherardi G, Gracciotti N, Pocognoli A. Comparative evaluation of Xpert MTB/RIF and the new

Xpert MTB/RIF ultra with respiratory and extra-pulmonary specimens for tuberculosis case detection in a low incidence setting. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* [Internet]. 2019; 15: 100094. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2019.100094>

74. Devonshire AS, O'Sullivan DM, Honeyborne I, Jones G, Karczmarczyk M, Pavšič J, et al. The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2016; 16(1): 1–10.

+ Publicación Tesina
(Incluido en el precio)



1500 HORAS
60 ECTS

Máster en catástrofes, emergencias y ayuda humanitaria



+ Publicación Tesina
(Incluido en el precio)



2.495 € PDF

1500 HORAS
60 ECTS

Máster en Salud Laboral en el Medio Sanitario



Nueva
UNIVERSIDAD



Universidad
Isabel I

MASTER DE 60ECTS/1500H
EXPERTOS DE 30ECTS/750H