



FOCUS on Field Epidemiology

Enfoque en Epidemiología de Campo

CONTRIBUYENTES

Autores:

Amy Nelson, PhD, MPH
Lauren N. Bradley, MHS
FOCUS Workgroup*

Críticos:

FOCUS Workgroup*
Gloria C. Mejía, DDS, MPH, PhD
(Versión en español)

Editoras de Producción ::

Tara P. Rybka, MPH
Lorraine Alexander, DrPH
Rachel A. Wilfert, MD, MPH
Gloria C. Mejía, DDS, MPH, PhD
(Versión en español)

Jefe de Edición:

Pia D.M. MacDonald, PhD, MPH

Traducción al español por:

Pelusa Orellana

* Todos los miembros del Grupo de Trabajo FOCUS están nombrados en la última página de la publicación.*

Diagnóstico de Laboratorio: Técnicas moleculares

¿Te has sentado alguna vez con tus colegas microbiólogos a conversar - lo que pensabas sería una agradable charla- sólo para darte cuenta que te encontrabas totalmente perdido? Comienzas a hablar sobre el clima, cuando un colega te pregunta, “Y bien, ¿hiciste el PFGE en el MRSA?” Otro colega dice, “No, tengo problemas con el ADN. ¿Alguno de ustedes ha hecho RFLP en MRSA?” El primer colega responde. “Mmm, no que yo sepa, pero tal vez el PCR podría funcionar...” y siguen hablando, hasta un punto en que no sabes si tu RFLP está en el PCR o tu PFGE se perdió camino a MRSA.

Cuando te pones a pensar así, en cosas sin sentido, probablemente es que la biología molecular te está deprimiendo. Afortunadamente FOCUS te levantará el ánimo al entregarte un repaso sobre las pruebas de diagnóstico molecular. Así, la próxima vez que te sientes con un microbiólogo a la hora del café, incluso tendrás una o dos sugerencias que hacer.

Como se observó en la última edición de FOCUS, las técnicas de laboratorio tales como el cultivo, microscopía, serología, fagotipificación y métodos moleculares se pueden usar tanto para verificar la presencia de un organismo como para identificarlo. Las técnicas moleculares que incluyen el ADN o ARN son instrumentos especialmente poderosos para el profesional de laboratorio.

En esta edición de FOCUS miraremos en detalle estas técnicas moleculares y discutiremos las más usadas comúnmente en salud pública:

reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) y ribotipificación.

¿Qué es el ADN?

Lo has escuchado anteriormente: la hélice doble. ADN (ácido desoxirribonucleico) es esa molécula enroscada parecida a una escalera que es el material genético presente en toda bacteria, planta y animal. El ADN es el código usado para construir todas las moléculas que forman un organismo vivo. Algunos virus también tienen ADN, aunque otros tienen ARN como su material genético.

El ADN está compuesto de una cadena larga de cuatro unidades moleculares especiales-adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G), llamadas bases. Cada base se une a una pareja (A con T, C con G) como los dos lados de una escalera que están unidos por los peldaños. Juntos, se les conoce como pares de bases. Las bases se disponen en un orden exacto denominado secuencia, como por ejemplo, AATTCGCG o CATAGCGTA.

Este patrón de As, Ts, Cs, y Gs es como una receta para la proteína que será creada por ese pedazo específico de ADN. El ADN también codifica el ARN, pero en el ARN, la timina (T) se reemplaza por uracilo (U). Para replicar el ADN o crear proteínas, los dos lados de la escalera del ADN se separan y nuevas bases se aparean con la secuencia existente. El ARN se usa en células vivas como el mensajero de copia del ADN. A partir del patrón de ADN, la célula hace una copia de

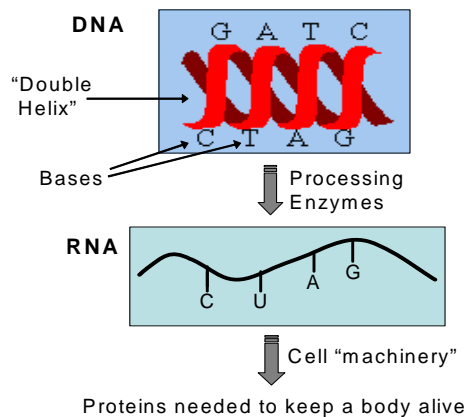


UNC
GILLINGS SCHOOL OF
GLOBAL PUBLIC HEALTH

NORTH CAROLINA CENTER FOR PUBLIC HEALTH PREPAREDNESS

The North Carolina Center for Public Health Preparedness is funded by Grant/Cooperative Agreement Number U90/CCU424255 from the Centers for Disease Control and Prevention. The contents of this publication are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the views of the CDC.

Figura 1. ADN convertido en ARN en una célula viva.



ARN. Luego el ARN se desplaza por toda la célula llevando el código para crear y mantener el ser vivo hacia la maquinaria de construcción celular (ver figura 1).

Existe mayor información sobre el ADN en los recursos adicionales disponibles en la página 4.

¿Por qué es útil el ADN en la Epidemiología?

Desde el punto de vista de un epidemiólogo, los aspectos útiles de las secuencias de ADN es que pueden ser usadas para identificar el organismo que causa un brote de enfermedad. Algunas secuencias de ADN son únicas para cada organismo.

En un caso de enfermedad gastrointestinal, una muestra fecal podría ser examinada para buscar la presencia de ADN de varios organismos diferentes. Si el ADN de un organismo específico se detecta, dicho organismo puede ser la causa de la enfermedad.

De manera similar, el examen de las secciones correctas de ADN puede permitir distinguir entre dos cepas diferentes de la misma especie microbiana. Algunas secuencias serán exactamente iguales entre cepas de la misma especie, mientras que otras secuencias tendrán áreas diferentes que podrán ser usadas para distinguir una cepa de otra.

Esta propiedad de las secuencias de ADN resulta útil para determinar si diferentes casos de la misma enfermedad realmente forman parte de un brote.

Por ejemplo, si se identifica *Norovirus* en dos casos de enfermedad gastrointestinal, éstos pueden o no ser parte del mismo brote. Si determinas que se trata de cepas distintas de *Norovirus*, sabrás que los casos no están relacionados.

Si los casos tienen la misma cepa, podrían haber adquirido la infección a partir de la misma fuente, o un caso

podría haber transmitido la infección al otro.

El uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa para examinar las secuencias del ADN te ayudará a identificar cuál es la cepa del patógeno presente en una muestra.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

Esta es una técnica de laboratorio que realiza copias múltiples de un fragmento de ADN o ARN en un proceso denominado amplificación. La amplificación facilita la detección de minúsculas hebras de ADN de un organismo generando varias copias del ADN con las cuales se trabaja durante el análisis. Asimismo, el PCR puede comenzar con cantidades muy pequeñas de ADN, lo cual es una ventaja si la muestra contiene un número limitado de organismos a partir de los cuales obtener el ADN o si el organismo no puede ser cultivado. El PCR puede usarse tanto en virus como en bacterias.

El PCR comienza con una muestra del ADN de interés, como por ejemplo el proveniente de una muestra clínica que se sospeche contenga un patógeno. Luego se agrega un iniciador o *primer* a la muestra. El iniciador es una secuencia muy corta de ADN que buscará y se unirá a una secuencia específica del ADN que se busca. El iniciador es el elemento clave: puede diseñarse para ser muy específico, por ejemplo para concordar con *echovirus* 30, o puede diseñarse de manera que sea más general, por ejemplo, para que concuerde con cualquier *echovirus*.

De entre los demás materiales que se agregan a la mezcla se incluyen una enzima polimerasa que “leerá” la secuencia de ADN y creará copias, y los “bloques de construcción” de las bases de ADN que pueden ser usados como materia prima para realizar las copias. La enzima polimerasa hará copias sólo del ADN que concuerda con el iniciador. Luego, si el ADN ha sido amplificado, sabremos que el ADN de la muestra concordó con el que se usó en el iniciador. Si el ADN no logra amplificarse, la bacteria específica que se diseñó para que concordara no está presente en la muestra. Se deberán realizar entonces, nuevas pruebas para determinar si bacterias diferentes estaban presentes.

Por lo tanto si tú crees que la *Salmonella* está causando un brote de diarrea, amplificarías un gen que fuese único de la *Salmonella*. Después de la reacción PCR usarías los genes amplificados por el PCR para confirmar que el organismo es, sin lugar a dudas, *Salmonella*. Al igual que con las técnicas de detección e identificación que requieren una muestra del organismo, la toma adecuada de muestra, envasado y almacenado son esenciales (ver FOCUS Volumen 4, edición 2 para mayor información sobre toma de muestras). Si el organismo no sobrevive el viaje desde el paciente o desde el escenario del brote al laboratorio, puede ser difícil o imposible de identificar.

Figura 2. Comparación de secuencias de ADN de un gen de nucleoproteína en infecciones de dos pacientes con distintas cepas de rabia.

a. Secuencia de genes AY138566; virus de la rabia aislado 1360, India
b. Secuencia de genes AY138567; virus de la rabia aislado 945, Kenya

Line 1a	g	a	a	a	a	a	a	a	a	c	t	t	c	a	a	a	a	a	t	a	t	g	a	c	a	c	g	g	c	a			
Line 1b	g	a	a	a	a	a	a	a	a	a	c	t	t	c	a	a	a	a	a	t	a	t	c	g	a	c	a	c	g	g	c	t	
Line 2a	g	a	a	t	t	g	a	c	a	a	a	g	a	c	t	g	a	c	g	t	a	a	g	c	c	g	c	t	g	g	c	a	
Line 2b	g	a	a	c	t	g	a	c	a	a	a	a	g	a	c	t	g	a	c	g	t	a	a	g	g	c	a	t	t	g	g	c	a
Line 3a	g	a	t	g	a	t	g	g	a	a	c	t	g	t	c	a	a	t	t	c	a	a	g	g	a	t	g	a	c	g	a	g	
Line 3b	g	a	t	g	a	t	g	g	a	a	c	t	g	t	c	a	a	c	t	c	a	a	t	g	a	c	g	a	t	g	a	g	

Las diferencias entre las secuencias aparecen en los recuadros. La secuencia exacta de genes en un microorganismo puede ser usada para identificar ese organismo o cepa.

La secuencia completa se encuentra disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Huella genética del ADN

Si aún no estás seguro de cuál podría ser el organismo infeccioso después de llevar a cabo el PCR en la muestra, probablemente efectuaste una reacción PCR no específica (es decir, amplificaste cualquier material genético presente). Con el material genético obtenido después de la amplificación, tu paso siguiente es secuenciar el ADN.

Puedes determinar el orden específico de las bases en el(los) tramo(s) que ampliaste. Esta secuencia específica de As, Ts, Gs, y Cs pueden entonces ser comparadas con secuencias conocidas de un organismo o cepa, para determinar el ADN del organismo o cepa que concuerda con la secuencia que obtuviste. Para un ejemplo de comparación de ADN, ver la figura 2.

También es posible que la secuencia amplificada de ADN sea la de un gen conocido de un organismo específico. Si el laboratorio sospecha de *Salmonella* y realiza el experimento para amplificar el ADN de un gen de *Salmonella*, este gen será amplificado si la *Salmonella* fuese el organismo causante de la infección. El gen no se amplificará si la *Salmonella* NO resultara ser el causante. Después de la amplificación por PCR, el técnico de laboratorio usará el producto de PCR sobre un gel especial que ayuda a visualizar el ADN (más adelante se hablará más acerca de los geles). Debido a que el gen que nos interesa es conocido, sabemos cuántos pares de bases debe tener (es decir, qué tan grande es la secuencia). Una vez que vemos nuestra muestra de ADN en el gel, podemos determinar si el gen está presente y si tiene la longitud del segmento adecuada. Si es así, el organismo es el que buscamos (ver figura 3).

El ADN obtenido a través de PCR también puede ser pro-

cesado aún más para identificar su huella del ADN, un patrón sobre el gel que identificará al organismo (más detalles sobre esto más adelante). La huella del ADN por lo general se realiza cuando un organismo en particular resulta ser sospechoso, con el fin de determinar cuál cepa del organismo se encuentra presente.

- Por ejemplo, la tuberculosis (TB) tiene síntomas claros, pero la huella del ADN se puede usar para determinar si distintos casos de TB han sido infectados con la misma cepa, posiblemente durante un brote o una exposición común.

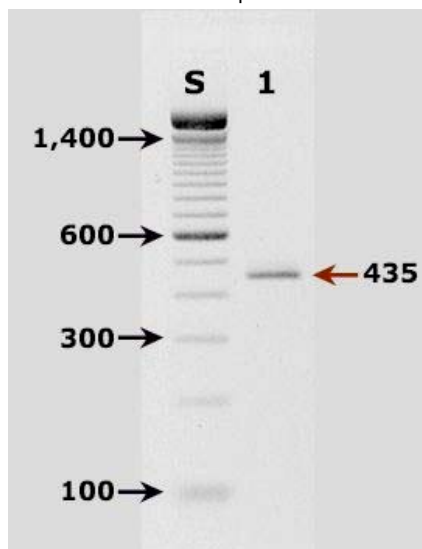
¿Cómo trabaja un gel?

El producto del PCR es colocado en uno de los extremos del gel, de manera similar a como un corredor se ubica y prepara para su carrera alrededor de la pista. Si el organismo es desconocido, el producto PCR será dividido primero en partes por una enzima especial que corta el ADN donde quiera que haya una secuencia conocida. Un pequeño campo eléctrico se aplica entonces en el gel, lo cual hace que el ADN se traslade por el gel de una punta a la otra.

La distancia recorrida por el ADN depende de la secuencia de ADN y del largo de la(s) pieza(s) de ADN. Las bases de ADN A, T, C y G tienen cargas eléctricas naturales que determinan la velocidad y dirección en la que un fragmento de ADN se puede desplazar cuando se aplica un campo eléctrico sobre el gel. Las partículas cargadas negativamente (A y T) tienden a moverse más rápidamente, mientras que las partículas positivas (C y G) se mueven más lentamente sobre el gel. Adicionalmente,

Figura 3. Imagen de un gel PCR para diagnosticar *Cryptosporidium parvum* a partir de una muestra fecal.

Cada banda oscura representa muchas hebras de ADN que tienen la misma longitud.



La franja denominada "S" es el fragmento de ADN; como un marcador de distancia para el ADN, cada banda muestra hebras de ADN con un número específico de pares de bases (marcados en el lado) que pueden ser usados para medir el largo del ADN amplificado en la reacción PCR. En este caso, el par base 435 de *C. parvum* es una identificación positiva. (1)

cada fragmento de ADN es único en tamaño, dependiendo del lugar en que la enzima que corta el ADN lo dividió. Los fragmentos más pequeños de ADN se desplazarán a través del gel a una velocidad más rápida que los más grandes.

Después de un período determinado de tiempo, el campo eléctrico se apaga, congelando la carrera de ADN de manera que el científico puede examinar el patrón de ADN sobre el gel. Se utilizan técnicas específicas para observar los grupos de ADN que aparecen como bandas sólidas sobre el gel (ver la figura 3). Cuando este proceso se lleva a cabo en dos organismos distintos, el resultado mostrará dos patrones de ADN muy diferentes, de la misma manera que las huellas dactilares de dos personas se ven muy distintas para quien es experto en su identificación. Si las muestras de un organismo tomadas de dos pacientes tienen exactamente el mismo patrón de ADN, estas dos personas fueron infectadas por el mismo organismo, lo que avala la posibilidad de un brote.

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés)

El ADN también puede ser detectado por *PFGE*, el cual se utiliza para el análisis de fragmentos grandes de ADN. El *PFGE* es ventajoso porque requiere de menos procesamiento y preparación de la muestra de ADN. Para realizar un *PFGE*, se pueden usar enzimas especiales para cortar el ADN en unos pocos fragmentos más bien grandes. En lugar de aplicar un campo eléctrico de manera que los fragmentos de ADN corran rectos hasta el final, después que se aplica el campo eléctrico se cambia la dirección, y luego se vuelve a cambiar, y luego una vez más.

Esto es como una carrera compuesta completamente por varios corredores lentos. Al comienzo, ocupan tanto espacio y son tan lentos, que puede resultar difícil separarlos unos de otros, parecen ser una sola masa de corredores. Una vez que comienzan a correr, la meta es desplazada desde su lugar directamente frente a ellos hacia un punto 400 yardas a su izquierda. Una vez que los corredores logran darse vuelta y desplazarse hacia la nueva meta, ésta se cambia a su punto original. Todos los corredores se dan vuelta y avanzan hacia esta meta otra vez.

Al cambiar las direcciones se separan los corredores (los trozos de ADN) en dos planos y se esparce el ADN de manera más clara. El campo eléctrico es generalmente aplicado en un patrón hexagonal, de manera que el campo se alterna en seis direcciones diferentes.

PulseNet

En asociación con los departamentos de salud estatal y la Asociación de Laboratorios de Salud Pública (APHL) de Estados Unidos, el CDC está creando una red de subtipificación molecular llamada PulseNet, que se basa en la identificación de ADN de bacterias causantes de enfermedades relacionadas con alimentos.



El proyecto está siendo implementado primero para la *Escherichia coli* 0157-H7, y luego será extendido para incluir *Salmonella typhimurium* y otros patógenos relacionados con los alimentos. Todos los participantes utilizarán equipos y protocolos estandarizados y se almacenará una base de datos centralizada de patrones de ADN (“huellas genéticas del ADN”) en un servidor computacional en el CDC.

A través de la participación del Departamento de Agricultura y la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos, la base de datos incluirá huellas genéticas derivadas de alimentos contaminados y de aislados clínicos.

Sitio web: <http://www.cdc.gov/pulsenet/>

El *PFGE* se utiliza para identificar bacterias, pero no virus. El ADN usado para análisis con *PFGE* puede extraerse de un microorganismo en cultivo, de una muestra clínica, o de una muestra ambiental. Al igual que en geles comunes y corrientes, el *PFGE* se puede usar para identificar un organismo o para distinguir entre cepas del mismo organismo para determinar si varios casos de enfermedad se relacionan unos con otros (cepas idénticas) o no (cepas diferentes). Sin embargo, el tiempo para *PFGE* es más largo que el tiempo requerido con un gel normal.

- Por ejemplo, volvamos al brote mencionado en la última edición de FOCUS acerca de infecciones por *Escherichia coli* 0157:H7 entre residentes de Colorado en junio de 2002. (2) En este brote la definición de caso requirió que el *E.coli* fuese cultivado a partir del paciente. Además, la definición de caso requería que todos los cultivos fueran usados para precisar la definición de caso. Los investigadores de Colorado no quisieron incluir en el brote cada caso de *E.coli* encontrado en la ciudad, sólo los casos que eran de la cepa exacta que les interesaba.

Los patrones de *PFGE* suelen ser usados de esta manera para conectar casos durante un brote. Pese a que el *PFGE* no es útil para sacar huellas genéticas de cada orga-

Recursos adicionales:

The Columbia Electronic Encyclopedia: búsquedas sugeridas sobre ácidos nucleicos y huella genética del ADN.

Disponible en: <http://education.yahoo.com/reference/encyclopedia/>

Source Molecular Company: un uso interesante de las técnicas moleculares para la calidad del agua.

Disponible en: <http://www.sourcemolecular.com/ribotyping.htm>

nismo bacterial, puede usarse para identificar una gran cantidad de patógenos, tales como *E.coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella*, *Pseudomonas*, y otros.

Ribotipificación

La ribotipificación es otra técnica de diagnóstico molecular. Su nombre deriva del ribosoma, que es parte de la maquinaria celular que fabrica proteínas. Los ribosomas se encuentran solamente en las células, por lo tanto la ribotipificación es un método de identificación de bacterias, no virus. (Los virus son moléculas con material genético y proteína solamente. No tienen estructura celular).

Un ribosoma está compuesto de ARN que se dobla sobre sí mismo de manera particular. Este ARN se denomina "ARNr" por ARN ribosomal. Observamos al inicio de esta edición que el ADN codifica el ARN. Ya que todas las células vivas, desde las lagartijas hasta los seres humanos, crean proteínas, los genes de ADN que codifican el ARNr tienen mucho en común, incluso a lo largo de especies bien diferentes. Sin embargo, algunas partes de los genes que codifican el ARNr son altamente variables. Esto quiere decir que ciertas secuencias son bien distintas de una especie a la otra, o incluso de una cepa bacteriana a otra. Estas regiones variables se pueden utilizar para identificar un tipo específico de bacteria.

¿Cómo se determinan estas regiones variables? Al igual que en otros métodos de

análisis de ADN, se utilizan enzimas que cortan el ADN. Estas enzimas dividen el ARN sólo cuando ocurre una secuencia específica. De este modo, si una cepa bacteriana tiene dicha secuencia en su ARNr, éste será cortado en esa ubicación. Si otra cepa bacteriana tiene unas pocas bases distintas en el mismo lugar, el ARNr no será cortado. El ARNr luego se observa sobre un gel de manera que es posible ver el número y tamaño de los segmentos (ver figura 4). El ARNr que ha sido cortado en los sitios esperados se verá distinto del ARNr que no fue cortado.

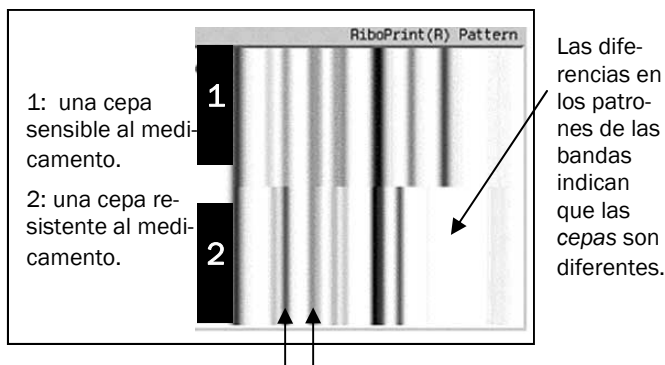
La ventaja de la ribotipificación como método de identificación de microorganismos infecciosos es que el procedimiento es completamente automático. No sólo implica menos trabajo en la realización del procedimiento, sino que el procedimiento es estandarizado. Sin embargo, debido al equipo necesario, la ribotipificación es más bien costosa, y por lo general se realiza en laboratorios de referencia. La ribotipificación se usa más comúnmente para tipificar cepas de *Staphylococcus aureus*, pero también puede ser usado para tipificar otras especies de estafilococos y para el *E.coli*.

En esta edición de *FOCUS* hemos discutido técnicas moleculares, es decir, análisis de laboratorio que utilizan el ADN o el ARN. Estas técnicas pueden ser usadas para identificar patógenos en una

muestra o determinar qué cepa de un patógeno en particular está causando la infección.

En una edición futura de *FOCUS* te llevaremos por los pasos del uso del diagnóstico de laboratorio en un escenario de brote, y te daremos ejemplos de investigaciones reales.

Figura 4. Una imagen de ribotipificación que muestra dos cepas de *Salmonella Newport* (3)



Las similitudes en los patrones de las bandas indican que las especies bacterianas son las mismas (*Salmonella Newport*).

Glosario:

Base: unidad molecular que forma la estructura de una molécula de ADN; el ADN tiene cuatro bases: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G).

ADN: cualquiera de los ácidos nucleicos que normalmente son la base molecular de la herencia; construidas por una doble hélice sujeta por uniones de hidrógeno.

Huella genética del ADN: un método de identificación mediante la determinación de la secuencia de pares de bases en el ADN de una persona (u otra criatura).

Ácidos nucleicos: macromoléculas bioquímicas compuestas de cadenas de nucleótidos que expresan información genética.

Ribosoma: estructura rica en ARN en la célula, que es el sitio en que se crean proteínas.

ARN: cualquiera de los ácidos nucleicos que contienen ribosa y uracilo como componentes, involucrados en el control de las actividades químicas celulares.

Virus: alguno de los diversos agentes infecciosos submicroscópicos compuestos de una cubierta de proteínas que rodea el ARN o ADN, capaz de crecer y multiplicarse solamente en células vivas.

CONTACTO:

The North Carolina Center for Public Health Preparedness

The University of North Carolina at Chapel Hill
Campus Box 8165
Chapel Hill, NC 27599-8165

Phone: 919-843-5561

Fax: 919-843-5563

Email: nccphp@unc.edu

Equipo de trabajo FOCUS:

- Lorraine Alexander, DrPH
- Meredith Anderson, MPH
- David Bergmire-Sweat, MPH
- Lauren N. Bradley, MHS
- Anjum Hajat, MPH
- Pia D.M. MacDonald, PhD, MPH
- Gloria C. Mejia, DDS, MPH
- Amy Nelson, PhD, MPH
- Tara P. Rybka, MPH
- Rachel A. Wilfert, MD, MPH

REFERENCIAS:

1. Johnson DW, Pieniasek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3849-3855.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating ground beef -- United States, June-July 2002. *MMWR Morb Mort Wkly Rep.* 2002;51:637-639. Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5129a1.htm>. Accessed November 30, 2006.
3. Fontana J, Stout A, Bolstorff B, Timperi R. Automated ribotyping and pulsed field electrophoresis for rapid identification of multidrug-resistant *Salmonellas* Serotype Newport. *Emerg Infect Dis* [serial online]. 2003;9:496-499. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no4/O2-0423.htm>. Accessed December 14, 2006.

Si le gustaría recibir copias electrónicas del periódico *FOCUS on Field Epidemiology* por favor llene la siguiente forma:

- NOMBRE: _____
- TÍTULO (S): _____
- AFILIACIÓN: _____
- CORREO ELECTRÓNICO: _____
- ¿Podemos contactar por correo electrónico a sus colegas?: Si es así, por favor incluya su correo electrónico a continuación

Por favor enviar por fax a: (919) 919-843-5563

O por correo a: North Carolina Center for Public Health Preparedness
The University of North Carolina at Chapel Hill
Campus Box 8165
Chapel Hill, NC 27599-8165

O en línea en: <http://www.sph.unc.edu/nccphp/focus/>

PRÓXIMOS TEMAS

- Diagnóstico de laboratorio en investigaciones de brote
- Rastreo de contactos
- Niveles de Bioseguridad

¡Estamos en Internet!

<http://www.sph.unc.edu/nccphp>