

# Avances en el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas y parasitarias

Alejandro Sweet-Cordero,\* José Ignacio Santos-Preciado,\*\*, \*\*\*

## Resumen

*Durante la última década la biología molecular ha pasado del ámbito del laboratorio de investigación a ser herramienta del laboratorio clínico. La aplicación de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y parasitarias, mediante la detección de ácidos nucleicos, han ido conociendo y es muy probable que, sin llegar a desplazar al laboratorio de microbiología tradicional, dentro de pocos años estas pruebas sean de uso común en algunos laboratorios de diagnóstico.*

*Se presenta una descripción detallada de las principales técnicas de biología molecular que actualmente se están aplicando o tienen un uso potencial para el diagnóstico, evaluación de progresión o respuesta a tratamiento de algunas enfermedades infecciosas y parasitarias.*

*Se hace hincapié sobre la racionalización de estas técnicas en laboratorios regionales de referencia o laboratorios de los Institutos de Salud, la importancia de seleccionar e implantar aquellas pruebas que brinden el mayor costo beneficio y la necesidad imperiosa de formar recursos humanos altamente calificados y adiestrados en la teoría y la práctica de la biología molecular.*

**Palabras clave:** Biología molecular. Enfermedades infecciosas, parasitarias, PCR, LCR, ADN, Arbovirología, Carga viral, Resistencia a antibióticos.

## Summary

*During the last decade molecular diagnostic techniques have moved from the research laboratory into the clinical microbiology laboratory. The application of molecular biology for the diagnosis of infectious and parasitic diseases by the detection of nucleic acids has steadily grown, and it is very probable that, while they may not displace the traditional diagnostic laboratory, they will be common place in the not too distant future.*

*A detailed description of the principal molecular diagnostic techniques that are currently being used or that have a potential use for the diagnosis, evaluation of disease progression or response to therapy of selected infectious and parasitic diseases, is presented.*

*Emphasis is placed on the rational use of these techniques in regional reference laboratories or highly specialized hospitals; the importance of selecting and implanting those diagnostic techniques with the highest cost-benefit ratio; and finally, the need to train human resources which are highly qualified in the theory and practice of molecular biology.*

**Key words:** Molecular biology; Infectious diseases. Parasitic diseases, PCR, LCR, Branched, DNA, Viral load, Antibiotic resistance.

Departamento de Pediatría, Universidad de California en San Francisco

\*\* Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM

\*\*\* Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades, Secretaría de Salud

Correspondencia y solicitud de Sobretiros: -coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades, Secretaría de Salud, San Luis Potosí 199-10<sup>o</sup>, Piso, Col. Roma, 06700 México, D.F.

## Introducción

En los últimos veinte años, la biología molecular ha experimentado un desarrollo vertiginoso. Cada vez es mayor nuestra capacidad para manipular, amplificar y analizar los ácidos nucleicos. Desde la primera descripción de las técnicas de hibridación y especialmente con el desarrollo de métodos para la amplificación enzimática de una secuencia determinada de ADN, la biología molecular ha pasado de ser un conjunto de técnicas de difícil manejo en laboratorios de ciencias básicas, especializados, a ser algo que cada vez promete tener mayor utilidad en el laboratorio clínico.

Actualmente, la detección de ácidos nucleicos tiene ya aplicación en el diagnóstico e infectología. Sin embargo, cabe señalar que las predicciones de aquellos que creían que el laboratorio de microbiología tradicional desaparecería en favor de laboratorios puramente moleculares no se ha realizado y es posible que nunca lo haga. Probablemente la biología molecular jugará un papel central en algunas infecciones de difícil diagnóstico y en otros casos será únicamente una técnica de apoyo en circunstancias específicas. Es imperativo que tanto los clínicos como los laboratoristas tengan un conocimiento amplio de la teoría y de la práctica de estas técnicas para poder entender el significado de los resultados que se obtienen y las limitaciones de los mismos.

Existen varios obstáculos para la aplicación de técnicas de detección de ácidos nucleicos para el laboratorio clínico en los países en vías de desarrollo. En primer lugar está el costo de los equipos y los reactivos necesarios para equipar un laboratorio de este tipo. Por otro lado, está la falta de capacitación del personal técnico en la metodología de la biología molecular. Algunos autores han comentado sobre la utilidad de estas nuevas tecnologías para hacer frente a problemas de los países en vías de desarrollo. Su uso extendido en los países de América Latina dependerá de la disponibilidad de personal con los conocimientos básicos en la teoría y la práctica de la biología molecular.<sup>1</sup>

En especial se ha hecho énfasis en la necesidad de coordinar esfuerzos dentro del Sector Salud para hacer uso racional de la biotecnología para resolver problemas específicos de cada país.<sup>2</sup>

Desafortunadamente existen todavía pocas investigaciones realizadas en los países con recursos limitados, tratando de hacer una valoración objetiva en cuanto a la utilidad real de estas técnicas con relación.

A continuación se presenta una descripción detallada de las principales técnicas de biología molecular que actualmente se están aplicando para fines diagnósticos. Posteriormente se hace énfasis en aquellas áreas en las que estas técnicas han demostrado tener mayor utilidad o tienen un uso potencial determinado. La epidemiología molecular es otro campo muy amplio que merece una revisión exhaustiva propia y aquí no se abordará.

## Reacción en Cadena con Polimerasa

En 1983, el doctor Kary Mullis, postuló que se podrían producir copias múltiples de un fragmento de ADN, por un proceso bastante sencillo.

Utilizando una enzima que normalmente se encarga de sintetizar el ADN (ADN polimerasa) y pequeños fragmentos de ADN complementarios a un ADN determinado (sondas), inventó lo que actualmente se conoce como reacción de polimerasa en cadena o PCR por sus siglas en inglés. La importancia de este descubrimiento fue reconocido en 1993 por el Comité del Premio Nobel, el cual otorgó al doctor Mullis el más alto reconocimiento que existe en el mundo científico por este hallazgo.

El descubrimiento de la PCR tuvo como resultado una verdadera explosión en las posibles aplicaciones de la biología molecular para el diagnóstico. Al modificarse la técnica original para incorporar el uso de una enzima termoestable aislada de una bacteria que vive a altas temperaturas, se hizo posible su aplicación a gran escala.<sup>4</sup> Actualmente nuevas enzimas termoestables con funciones múltiples prometen ampliar aun más el potencial de esta técnica.<sup>5</sup>

La PCR es una técnica para amplificar exponencialmente el número de copias de un fragmento de ADN. Para poder lograr esta amplificación, se requiere conocer la secuencia (o parte de la secuencia) del fragmento que se quiere amplificar. El fragmento de ADN blanco de este

proceso puede ser ADN genómico, ADN plasmídico o ADN en una muestra de sangre, esputo, jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo, etc., para fines de diagnóstico, el fragmento amplificado generalmente es de entre 100-1000 pares de bases.

Cada reacción de PCR consta de tres pasos fundamentales (ver figura 1). El primero es el de desnaturalización por calor de las dos hebras que constituyen el ADN. Este primer paso generalmente ocurre a una temperatura de 90 a 95 grados centígrados. El segundo paso es el de hibridación de las sondas y generalmente se lleva a cabo entre 45-60 grados centígrados.

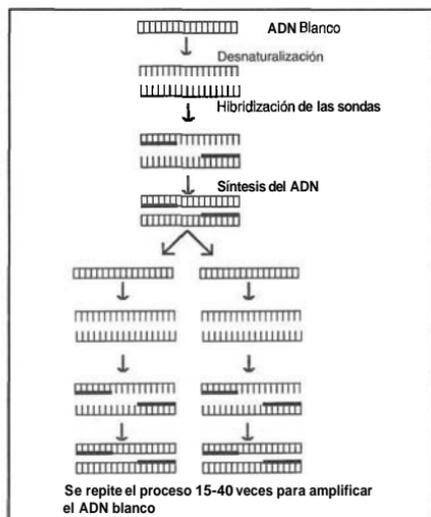


Figura 1. Amplificación del ADN por medio de la reacción en cadena con polimerasa.

La temperatura exacta depende de la secuencia de las sondas, su longitud, y el grado de identidad entre las sondas y la secuencia del ADN blanco. Las secuencias que contienen altos porcentajes de guanina o citosina son más estables y se pueden hibridar a temperaturas más altas. Existen incluso fórmulas para calcular la temperatura ideal de hibridación de una sonda tomando en

cuenta estos factores.<sup>6</sup> El tercer paso es el de extensión o síntesis del ADN. Este paso generalmente se lleva a cabo a 70-75 grados centígrados. En teoría, la PCR puede amplificar una sola molécula mil veces ( $10^3$ ), si se llevan a cabo 10 ciclos, un millón de veces ( $10^6$ ) si se llevan a cabo 20 ciclos y mil millones de veces ( $10^9$ ) si se llevan a cabo 30 ciclos.

La PCR también se puede llevar a cabo a partir de una molécula de ARN, ya sea para detección o cuantificación de un virus con genoma de ARN. Esta técnica se conoce como RT-PCR o reacción en cadena con polimerasa con transcripción reversa.

Para la aplicación de la PCR en el laboratorio clínico se requieren de tres pasos fundamentales: 1) preparación de la muestra, 2) amplificación del ADN blanco y 3) detección. La preparación de la muestra dependerá de su tipo. Por ejemplo, se puede amplificar ADN en líquido cefalorraquídeo simplemente hirviendo la muestra. Otro tipo de muestras como la sangre y el esputo requieren de un tratamiento más extensivo, debido a la presencia de sustancias que inhiben el funcionamiento de la polimerasa de ADN. A veces es necesario hacer una purificación parcial de ADN de una muestra para poder purificar el ADN. Esto tiene la desventaja de que es laborioso y muchas veces resulta en una disminución en la sensibilidad de la técnica al perderse parte del ADN en el proceso de purificación. Existen muchos métodos descritos para purificar el ADN de una muestra. El uso de resinas que fijan el ADN es uno de los más sencillos.<sup>7</sup>

La detección de la muestra amplificada se puede lograr de varias maneras. Lo más fácil y económico es el corrimiento de la muestra en gel de agarosa con tinte con bromuro de etidio. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que no se confirma si la secuencia amplificada realmente era la deseada. Además, la sensibilidad de la detección en gel de agarosa es limitada, ya que se requieren aproximadamente 20 ng de ADN para poder visualizarse en gel. El hecho de que el fragmento amplificado y visualizado en gel sea del tamaño anticipado, no quiere decir que la secuencia del mismo sea la correcta. El dot blot o el Southern blot tienen la ventaja de que solamente detectan la secuencia deseada. El método de captura del producto amplificado en pozos tipo ELISA tiene la ventaja de que es específico y además no requiere

de material radioactivo.<sup>8,9,10</sup> También permite el manejo de muchas muestras a la vez y se obtienen resultados numéricos con un lector de ELISA, lo cual facilita la interpretación de resultados.

Probablemente se deba a esto el hecho de que la mayoría de los estuches ó "kits" comerciales para PCR detectan el producto amplificado por medio de un sistema de captura tipo ELISA. Este sistema tiene la ventaja de que utiliza reactivos y equipos que ya se utilizan para otros fines en muchos laboratorios clínicos.

### Replicación autosostenida de secuencias (3SR/NASBA)

La técnica conocida como 3SR fue descrita por primera vez por Gautelli y colaboradores.<sup>11</sup> Posteriormente se describió un sistema muy parecido llamado NASBA (nucleic acid sequence-based amplification).<sup>12,13</sup> Esta técnica ofrece una alternativa isotérmica para replicación de ácidos nucleicos basada en el método multienzimático que utilizan los retrovirus. A diferencia del PCR, en la replicación autosostenida lo que se amplifica es el ARN. Este sistema requiere de la acción coordinada e isotérmica de las enzimas transcriptasa reversa, ARNasa H y polimerasa de ARN T7 para amplificar una secuencia de ARN a partir de intermediarios de cDNA (ADN complementario) (Figura 2). En el primer paso un oligonucleótido que contiene el promotor para la ARN polimerasa T7 se hibrida al ARN blanco.

En el segundo paso, la transcriptasa reversa se une a este oligonucleótido y produce una sola copia de ADN a partir de la transcripción reversa del ARN blanco. En el tercer paso la RNasa H destruye la hebra de ARN original. En lugar de esta hebra de ARN se hibrida un segundo oligonucleótido complementario a la primera hebra de ADN. De tal forma se obtiene una doble hebra de ADN a partir del ARN blanco original. Ya que éste contiene un primer o cebador con el promotor de la polimerasa de ARN T7 en cada extremo, es un sustrato para que esta enzima empiece a producir copias de ARN. Este ARN a su vez puede ser un sustrato para repetir todo el proceso de nuevo, y de esta manera se logra amplificar en forma logarítmica el ARN original.

La replicación autosostenida tiene algunas ventajas sobre la PCR. No requiere de un ciclador de temperaturas y al ser el ARN el blanco, permite amplificar secuencias de esta molécula sin el paso adicional que requiere la RT-PCR. Además, como blanco, el ARN es menos susceptible a los graves problemas de contaminación de la PCR ya que es menos estable en el medio ambiente que el ADN; sin embargo, el sistema multienzimático es bastante complejo y por lo tanto, más susceptible a inhibidores en muestras clínicas.

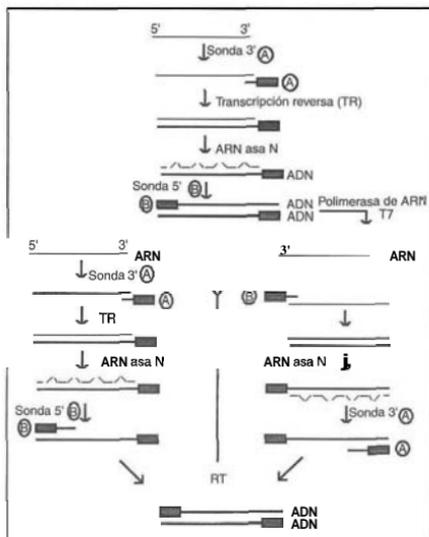


Figura 2. Método 3SR/NASBA para la amplificación de ARN.

### Reacción en Cadena con Ligasa (LCR)

La reacción en cadena con ligasa es un método de amplificación de ADN que utiliza una ligasa de ADN termoestable, así como una ADN polimerasa. En esta técnica, se mezclan cuatro oligonucleótidos de entre 20 a 24 pares de bases con el ADN blanco.<sup>14</sup> Las sondas se diseñan de tal forma que dos de las sondas se hibriden en posiciones cer-

canas a cada hebra de ADN blanco (ver figura 3) y de esta manera, las dos sondas se encuentran separadas por sólo unas cuantas bases.

Una vez que las sondas se hibridan al ADN blanco, la ADN polimerasa rellena el espacio entre las dos sondas y la ligasa los une. Esto resulta en la síntesis de un fragmento pequeño de ADN de aproximadamente 45 a 50 pares de bases. Estos fragmentos de ADN sirven como blancos para los siguientes ciclos de amplificación y se pueden detectar por medio de un sistema de captura tipo ELISA.

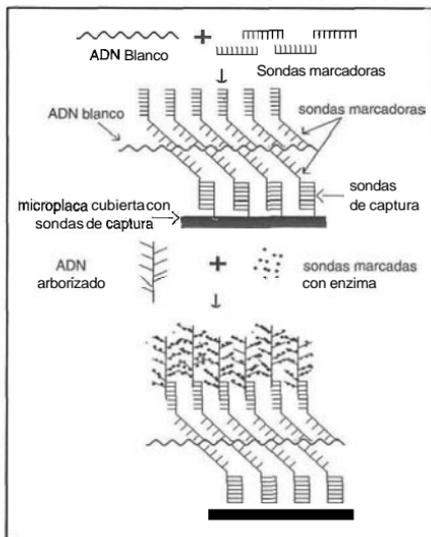


Figura 3. Esquema de la técnica de ADN arborizado para la detección de ADN por medio de la amplificación de la señal.

### bDNA (ADN arborizado)

El método conocido como bDNA (branched DNA o ADN arborizado), es un método para amplificación de una señal y no de un método de amplificación de un gen blanco.<sup>15</sup> En este método, el ARN a detectar se hibrida con sondas específicas fijadas a pozos de micro placas tipo ELISA.<sup>16,17</sup>

Posteriormente se utilizan sondas de ADN "arborizado" para hibridarse al complejo ADN-sonda fijo en el pozo. En una serie de pasos de hibridación, este ADN arborizado es a su vez fijado con oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina (ver fig. 3). Este proceso de "arborización" permite fijar más de mil moléculas de fosfatasa alcalina a una sola molécula de ARN mensajero. Este complejo es detectado por el uso de un sustrato mediante la técnica de quimioluminiscencia. Este método tiene la ventaja de que hay menos problemas de contaminación, ya que el ADN blanco no se amplifica.

### Contaminación

El problema más serio para la aplicación de técnicas moleculares para el diagnóstico es la contaminación, que puede ser causa de resultados falsos positivos. Existen dos fuentes principales de contaminación. La primera es la contaminación con material de otras muestras clínicas, especialmente en laboratorios en los cuales se procesa un gran número de muestras. La segunda y probablemente la más importante es la contaminación con ADN o ARN amplificado anteriormente.

El ADN suele ser bastante estable en el medio ambiente y no se ve afectado por técnicas tradicionales para descontaminar superficies (jabones, alcohol, etc). Además, el ADN se extiende fácilmente en un laboratorio por medio de aerosoles producidos por la misma manipulación de las muestras.

Por lo tanto, es muy importante que en los laboratorios en los cuales se trabaje cualquier técnica molecular para diagnóstico, haya un flujo unidireccional de muestras pre y post amplificación y que además se usen diferentes áreas e instrumentos para procesar muestras antes de la amplificación que los utilizados para procesar muestras amplificadas. Lo ideal es contar con una campana de flujo con sus propias micropipetas, únicamente para procesar muestras y otra campana con diferentes micropipetas para amplificar y procesar el producto amplificado. Se recomienda también el uso de puntas de micropipetas con filtros para evitar la formación de aerosoles.

Dado que aún con estos cuidados es imposible eliminar por completo la contaminación, se han desarrollado varias técnicas para evitar este problema. Una de estas técnicas utiliza la desoxiuridina trifosfato (dUTP) como nucleótido **sustrato** en la reacción en vez de desoxitimidina trifosfato. (dTTP). Esto da como resultado un producto amplificado que contiene dUTP en vez del dTTP del DN nativo. Este ADN sustituido por dUTP es susceptible a ser digerido por la enzima uracil-ADN glicosilasa. Si se agrega esta enzima a todas las muestras antes de ser amplificadas y se incuban antes de la amplificación, se destruye cualquier contaminante y se evita el problema. El ADN blanco no se destruye con este método porque la enzima uracil-ADN glicosilasa no afecta puesto que el ADN blanco contiene nucleótidos dTT.<sup>18</sup>

Otro método para prevenir los problemas que se derivan de la contaminación con producto amplificado es el uso de derivados del psoraleno como el isopsoraleno para la inactivación por enlace del producto amplificado.<sup>19</sup> En esta técnica se agrega el psoraleno al tubo de reacción para PCR antes de llevar a cabo la amplificación.

Después de la amplificación se expone el tubo a la luz ultravioleta, la cual activa al psoraleno para anelar el ADN amplificado. De tal forma que este ADN ya no es susceptible a ser amplificado y no podrá contaminar muestras subsecuentes. Espy y colaboradores han descrito con gran detalle la importancia de tomar en cuenta el tamaño del fragmento de ADN amplificado en el diseño de una técnica para la prevención de la contaminación.<sup>20</sup>

## Cuantificación

Tanto la PCR como la replicación autosostenida han sido modificadas para lograr la cuantificación del ADN o ARN blanco. La amplificación de ácidos nucleicos por cualquiera de estas técnicas sólo es lográbil en un margen limitado.

Después de un cierto número de ciclos ya no se duplica el ADN con cada ciclo adicional, puesto que los componentes de la reacción se agotan. Además, hay una variabilidad considerable en la cantidad de ADN producido incluso cuando la misma muestra se pone en reacciones separadas?

El método más aceptado para lograr una reacción que permita cuantificar el ADN o ARN blanco es el uso de un control interno que se amplifica con las mismas sondas que la secuencia blanco. Para poder comparar la amplificación del ADN o ARN blanco con el control interno, es necesario que la secuencia de este último sea casi idéntica al blanco, pero lo suficientemente diferente para poder diferenciar los dos fragmentos en el momento de la detección. Se ha descrito un gran número de técnicas para lograr esto, que van de la mutación puntual para producir un sitio de corte con enzima de restricción a la inserción de un fragmento adicional de ADN al control interno para diferenciarlo del ADN blanco.<sup>22,23</sup> La cantidad del ADN o ARN blanco en una muestra se determina comparando la señal que éste produce con el método de detección, con la señal producida por una curva de concentraciones del control interno amplificado en la misma muestra.

En el caso de la técnica de **bdNA**, la cuantificación se puede lograr sencillamente con el uso de una curva estándar con concentraciones de ADN conocidas. En un estudio reciente, Hendricks y colaboradores lograron cuantificar el ADN del virus de la hepatitis B por medio de una técnica de **bdNA**.<sup>24</sup> En su ensayo, el límite de detección fue de cerca de  $10^5$  moléculas/ml y lograron la cuantificación en un margen de concentraciones de cuatro logaritmos con un coeficiente de variación de entre 10 a 15%. Perillo y colaboradores han demostrado que aquellos pacientes con más de 200pg/ml de ADN de virus de la hepatitis B en el momento de comenzar terapia con **interferón alfa**, tienen menor probabilidad de responder al tratamiento, que aquellos pacientes con niveles menores de ADN/ml. Es posible que en un futuro cercano la medición de ADN en sangre llegue a tener utilidad clínica en la infección por el virus B de la hepatitis que tiene gran importancia mundial.<sup>25</sup>

En teoría, la PCR o alguna de las otras técnicas descritas con anterioridad podrían ser útiles para la detección en muestras clínicas de un **sin número** de agentes infecciosos, de hecho la literatura reciente ha descrito el uso de la PCR para varios de ellos tales como: *P. carinii*, *C. albicans*, *M. pneumoniae*, *B. pertussis*, *A. fumigatus*, etc.<sup>26,30</sup> Sin embargo, en la mayoría de los casos es

probable que estos métodos no encuentren utilidad práctica en la clínica. En algunos casos, esto se debe a que son patógenos poco frecuentes y no sería práctico para un laboratorio de diagnóstico montar la técnica. Hay otros patógenos para los cuales las técnicas tradicionales de identificación microbiológica han probado su utilidad y en los cuales la técnica molecular agrega poco desde el punto de vista práctico. También hay que tomar en cuenta que la identificación por sondas moleculares requiere de una suposición *a priori* de qué patógeno se busca, mientras que en general las técnicas microbiológicas pueden identificar muchos patógenos siempre y cuando se usen los medios de cultivo adecuados. Con base en lo anterior, aquí se hace énfasis en aquellas aplicaciones que ya están demostrando tener utilidad clínica.

### Cuantificación de carga viral en VIH

Las investigaciones recientes sobre la patogénesis del síndrome de inmunodeficiencia adquirida han demostrado que existe un alto nivel de replicación del virus desde el inicio de la infección.<sup>22, 31-33</sup> Esta replicación ocurre principalmente en el tejido linfático.<sup>34, 35</sup> La medición de la cantidad de virus en plasma, a pesar de ser un marcador indirecto de la replicación viral, cada vez está demostrando tener mayor utilidad. El grado de replicación del virus se estabiliza después de la infección primaria. Este nivel de expresión viral estable parece estar en  $10^2$  y  $10^6$  copias de ARN/mL de plasma y se mantiene en el paciente asintomático por meses o años.<sup>36</sup> Varios estudios han demostrado que el nivel de viremia en plasma durante este período de estabilización se relaciona estrechamente con el riesgo de progresión de la enfermedad. En un estudio reciente se demostró que los pacientes con menos de 5000 copias de ARN/ml de plasma tuvieron menor riesgo de progresión a SIDA y muerte. Aquellos pacientes con niveles de viremia mayores de 30000 copias/ml de plasma tuvieron mucho mayor riesgo de progresión a SIDA.<sup>37</sup> Recientemente, O'Brien y colaboradores demostraron que la medición de ARN de HIV en sangre periférica es un mejor marcador del estadio de la enfermedad que la medición de células CD4.<sup>38</sup>

Además de su utilidad para definir el riesgo de avance de la enfermedad, la medición de viremia en plasma, tiene utilidad para guiar el inicio de la terapia antiviral y para analizar la respuesta al tratamiento. Las recomendaciones recientemente publicadas por una mesa de expertos a nivel mundial, incluyen la medición de viremia en plasma como uno de los factores a considerar, tanto para el inicio de tratamiento antiviral como el seguimiento de estos pacientes una vez que han iniciado tratamiento.<sup>39</sup> Actualmente existen protocolos tanto de PCR<sup>40, 41</sup> como de bADN<sup>42, 43</sup> y 3SR/NASBA<sup>44</sup> para la cuantificación de ARN en plasma de VIH.

### Detección de VIH en la edad pediátrica

La transmisión vertical materno-infantil del VIH es la principal causa de infección por este virus en la edad pediátrica. El diagnóstico temprano del recién nacido infectado es importante desde el punto de vista terapéutico y para la prevención de infecciones oportunistas. Sin embargo, el diagnóstico en estos casos se dificulta porque anticuerpos IgG de la madre se transmiten al producto, aun en casos en los cuales no hay infección por el virus, causando falsos-positivos por el método de ELISA. La detección del antígeno p24 es poco sensible en las infecciones asintomáticas.<sup>45</sup> El cultivo del virus de sangre periférica requiere de grandes cantidades de sangre, un período de incubación largo y es relativamente poco sensible.<sup>46</sup>

Petru y colaboradores estudiaron la sensibilidad y especificidad de una técnica de PCR para la detección de VIH en niños de 0-3 años de edad. Utilizaron amplificación de dos fragmentos diferentes del gen gag de VIH (SK38/39 y Sk 101/145) para amplificar ADN de sangre periférica: en su estudio, la PCR tuvo una sensibilidad de 97% para detección de VIH en comparación con una sensibilidad del 92% para cultivo y de 65% para la detección del antígeno p24. Con base en estos resultados, estos autores recomiendan que la PCR pase a ser la prueba diagnóstica de elección para la identificación de niños infectados y que el inicio del tratamiento antiviral se base en los resultados de la PCR.<sup>47</sup>

La utilidad de la cuantificación de carga viral para determinar el pronóstico y el tratamiento para el paciente pediátrico todavía no ha sido definida como en el caso de la infección en adultos. Sin embargo, existen algunos estudios que sugieren que la cuantificación podría ser útil para medir la respuesta al tratamiento. Saag y colaboradores encontraron que tres niños con viremia tuvieron niveles menores de virus en plasma después de 4 meses de tratamiento con zidovudina.<sup>48</sup> Donovan y colaboradores estudiaron los niveles de ADN integrados al genoma y ADN no integrado en siete niños antes y después del inicio del tratamiento antirretroviral.

Encontraron que los niveles de ADN no integrado se redujeron a un 18% en promedio de los niveles antes del inicio del tratamiento.<sup>49</sup>

### Chlamydia

La infección por *Chlamydia trachomatis* puede causar uretritis, cervicitis y salpingitis en la mujer, uretritis y epididimitis en el varón y conjuntivitis y neumonía en el recién nacido. Por lo tanto, su diagnóstico y control son un reto importante para la salud pública. Los intentos por controlar la prevalencia de este patógeno se ven limitados por el alto número de personas infectadas que no presentan síntomas, pero son contagiosas. Tanto la PCR como la LCR han sido probadas como técnicas para el diagnóstico rápido de esta enfermedad.<sup>50-53</sup>

En un estudio realizado en Amsterdam, van Doornum y colaboradores encontraron que la sensibilidad y especificidad de la LCR para diagnóstico de chlamydia en muestras de orina de mujeres fue de 92.6 y de 100% respectivamente, en comparación con el cultivo. En orina de hombres, la sensibilidad fue de 86.2% y la especificidad de 100% en comparación con el cultivo.<sup>54</sup> Estos autores sugieren que esta técnica podría simplificar la detección de casos al hacer innecesaria la colección de muestras cervicales en mujeres, ya que la sensibilidad en orina fue bastante aceptable. Tanto la PCR como la LCR para *C. trachomatis* amplifican una secuencia que se encuentra varias veces en un plásmido de copia múltiple y de tal forma aumenta la sensibilidad del ensayo.

### Herpes Virus

La meningoencefalitis herpética es una complicación severa de la infección por Herpes simple que puede en muchos casos ser letal o causar secuelas de gravedad variable. La encefalitis por herpes virus responde adecuadamente al tratamiento con aciclovir si éste se inicia en forma oportuna. El estándar de oro para la detección de la meningoencefalitis herpética ha sido la biopsia de tejido cerebral con tinción apropiada y cultivo para la detección del virus.

El virus Herpes se logra cultivar del líquido cefalorraquídeo en menos del 10% de los casos en adultos. Debido a la dificultad en el diagnóstico y la importancia del inicio oportuno del tratamiento antiviral, la disponibilidad de métodos rápidos para detección molecular, sería particularmente útil en este tipo de infección. Un estudio reciente ha demostrado la utilidad de la PCR para la detección de este virus en líquido cefalorraquídeo. En este estudio se analizaron 101 muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes que habían sido sujetos a una biopsia cerebral para la detección del herpes virus. En este grupo, se detectó ADN de herpes en 53 de 54 casos de encefalitis por herpes detectado por biopsia (sensibilidad del 98%). De los pacientes en quienes la biopsia no detectó herpes virus, 44 fueron negativos por PCR (especificidad del 94%).<sup>55</sup>

### Micobacterias

La tuberculosis es actualmente la primera causa de mortalidad por un agente infeccioso en todo el mundo.<sup>56</sup> La detección oportuna de las infecciones por micobacterias ha sido tradicionalmente un problema difícil para el clínico. En la tuberculosis pulmonar, el diagnóstico preciso en casos que son BAAR-negativos requiere de cultivo que puede tardar de 2-8 semanas. En la edad pediátrica, la tuberculosis pulmonar o extra-pulmonar muchas veces es difícil de diagnosticar, ya que la mayoría de los niños infectados no son bacilíferos; además, el bajo porcentaje de pacientes en los cuales se logra un cultivo positivo y la ausencia, en la mayoría de los casos, de los síntomas característicos que se presentan en los adultos contribuyen a la dificultad en el diagnóstico.<sup>\*\*</sup> El porcentaje de cultivos positivos para *M. tuberculo-*

sis en muestras de jugo gástrico en pacientes pediátricos con probable tuberculosis pulmonar es inferior al 50% en los mejores casos.<sup>58</sup>

Existen actualmente varios métodos para la detección de micobacterias por medio de la PCR. El fragmento de ADN más utilizado para este fin es la secuencia repetida del transposón IS6110, del cual se encuentran entre 10-100 copias en el genoma de cada bacteria.<sup>59</sup> Esto permite aumentar la sensibilidad de la PCR al aumentar el número de moléculas blanco para la reacción. Otros autores han utilizado gen para la proteína de antígeno b (pab) y el gen *mtb64*.<sup>61</sup>

En un gran número de estudios, la PCR ha comprobado tener una alta sensibilidad para la detección de ADN de *M. tuberculosis* en muestras de esputo BAAR-positivas.<sup>62-65</sup> Sin embargo, la sensibilidad en muestras BAAR-negativas no está bien definida. Además se ha podido demostrar que incluso en laboratorios con experiencia en el manejo de muestras de micobacterias para diagnóstico molecular, la sensibilidad y especificidad de la técnica varía mucho. En un estudio en el cual se mandaron las mismas muestras a siete laboratorios con experiencia en esta área, se detectaron entre 3 a 20% de falsos positivos: con un laboratorio reportando un nivel extremo de 77%. Estos autores también reportaron una variabilidad en la detección de muestras con  $10^3$  micobacterias/ml de entre 2 y 90%.<sup>66</sup>

Esta preocupante falta de confiabilidad demostró, en forma contundente, la necesidad de contar con controles positivos y negativos en todos los pasos, desde el manejo de las muestras hasta la detección del producto de la amplificación.

Los resultados de algunos estudios más recientes, utilizando estuches comerciales para la detección de *M. tuberculosis*, son un poco más alentadores. Ichiyama y colaboradores compararon dos estuches comerciales, uno a base de amplificación de rARN (Gen-Probe)<sup>67</sup> y otro a base de la PCR (Amplicor, Laboratorios Roche). En su estudio, el método de rARN detectó 100% (74/74) muestras positivas por BAAR y por cultivo y 100% (47/47) muestras BAAR-negativas pero positivas por cultivo.<sup>68</sup> Este sistema detectó 23 muestras como positivas de un total de 278 muestras negativas por BAAR y por cultivo (8.2% de falsos positivos).

El método basado en la PCR (Amplicor) detectó 100% de muestras BAAR y cultivo positivas (83/83) y 94% (49/52) muestras negativas por BAAR, pero positivas por cultivo. El porcentaje de falsos positivos fue de 11.5%. Estos autores sugieren que la gran mayoría de los falsos positivos se deben a la presencia de ADN de micobacterias muertas y que la mayoría de las muestras positivas fueron de pacientes que anteriormente sí habían tenido cultivos positivos. Otro estudio reciente con el método de la PCR (Amplicor) con un número mayor de muestras (2,073 muestras total, 1,749 de las cuales fueron de esputo y las restantes de sitios extra pulmonares), también tuvo resultados alentadores. El método Amplicor detectó el 95% de las muestras positivas por cultivo. La sensibilidad en las muestras BAAR-negativas fue de 74%.<sup>69</sup> Es posible que el uso de paquetes comerciales haya eliminado la variabilidad en la sensibilidad y especificidad descrita por Noordhoek y colaboradores. En 1993, los CDC de los Estados Unidos de Norteamérica, aconsejaron que no se sustituyera el cultivo tradicional por la PCR para el diagnóstico de tuberculosis, dado los problemas que en ese momento se habían detectado,<sup>70</sup> es posible que con estos resultados recientes esto cambie, aun cuando por ahora el cultivo siga siendo el estándar de oro. Desafortunadamente, el costo de los estuches comerciales hará que esta técnica esté lejos de las posibilidades de muchos laboratorios.

Por ahora, las técnicas moleculares no han comprobado ser superiores al cultivo y al análisis por BAAR para el diagnóstico en adultos con tuberculosis. Sin embargo, para la identificación de cepas, el uso de estas técnicas tiene ciertas ventajas. En aquellos sitios en los cuales la prevalencia de infección por micobacterias atípicas (*M. kansasii*, *M. avium*, etc.) es muy alta, el uso de estas técnicas puede facilitar la decisión en cuanto al tipo de tratamiento que va a requerir el paciente. Esto es particularmente importante en lugares en los cuales se les da atención a un gran número de pacientes con SIDA. Ya que el tratamiento antifímico es muy diferente para las micobacterias atípicas, es importante conocer la especie antes de definir el esquema. Varios autores han definido secuencias de ADN que permiten diferenciar micobacterias tuberculosas de no-tuberculosas.<sup>71,72</sup>

La dificultad para la amplificación de *M. tuberculosis* probablemente se deba a varios factores. Muchas muestras de esputo contienen inhibidores enzimáticos que no permiten que funcione la polimerasa del ADN. Varios autores han descrito métodos para detectar inhibidores de la Taq polimerasa en muestras de esputo. Kolk y colaboradores sugieren correr una muestra por duplicado con una concentración conocida de micobacterias para detectar inhibidores.<sup>73</sup> Otros autores han construido fragmentos de ADN especiales como controles internos que se amplifican con las mismas sondas que el ADN control, pero tienen una diferencia en la secuencia interna que permite diferenciarlos.<sup>74</sup> Por otro lado, la membrana celular de las micobacterias tiene un alto contenido de lípidos que hacen muy difícil la extracción del ADN.

En el paciente pediátrico, un estudio reciente ha evaluado el uso de la PCR en comparación con el cultivo y el diagnóstico clínico para la detección de tuberculosis pulmonar en niños. Smith y colaboradores analizaron muestras de jugo gástrico de treinta y cinco pacientes entre 0-18 años de edad con tuberculosis y treinta controles.

La PCR tuvo una sensibilidad de 40% y una especificidad del 80% en comparación con el diagnóstico clínico. En su estudio, la sensibilidad del cultivo fue de 37%.<sup>75</sup> Estos resultados sugieren que la PCR en muestras de jugo gástrico no ofrece gran ventaja al cultivo para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en niños. Aun cuando los resultados de la PCR se obtienen más rápido que el cultivo, la decisión de tratar a un niño con antifímicos seguirá basada en el PPD y el análisis clínico del caso. Aún no existe un estudio que utilice alguno de los estuches comerciales para probar si éstos tienen mayor sensibilidad y especificidad en muestras pediátricas.

En la tuberculosis meningea es posible que la utilidad de la PCR sea mayor. Varios autores han demostrado su utilidad en estos casos<sup>76-78</sup> aunque el número de muestras analizadas es pequeño.

### Parasitología

No obstante la explosión de investigaciones en torno a la aplicación de técnicas de biología molecular a la infectología, la aplicación de estas

técnicas a la parasitología apenas comienza a rendir frutos. Esto se debe a la baja prevalencia de estas infecciones en los países desarrollados con mayores recursos para llevar a cabo este tipo de investigaciones. Sin embargo, éste es un campo amplio que en un futuro próximo comience a rendir resultados. Recientemente se ha publicado una revisión exhaustiva sobre este tema.<sup>79</sup>

Barker y colaboradores han descrito un método simplificado para la detección de *P. falciparum* en sangre, utilizando una técnica de PCR.<sup>80</sup> Esto promete ser útil en aquellos casos en los cuales la microscopía no confirme el diagnóstico, o cuando hay duda en cuanto a la especie responsable de la infección.<sup>80</sup> López y colaboradores han descrito un método sencillo aplicable a condiciones de recursos limitados para la detección de *Leishmania braziliensis*. Estos autores utilizaron sondas diseñadas para amplificar un fragmento común de ADN de minicírculo de este parásito, permitiendo distinguir infecciones por *L. braziliensis*, de aquellas causadas por otras especies de *leishmania*.<sup>81</sup>

Este método fue probado en sesenta y tres muestras de biopsia obtenida en una estación de campo en el Perú, encontrándose que la PCR detectó 87% de las muestras positivas por cultivo o microscopía. En la enfermedad de Chagas, el diagnóstico de la infección crónica es difícil, dado el bajo grado de parasitemia y generalmente se requiere de xenodiagnóstico con vectores no infectados. Se ha descrito un método para la amplificación de ADN de cinetoplasto de *T. cruzi* el cual fue comparado con serología, encontrándose una sensibilidad del 100% en un grupo de ciento catorce pacientes.<sup>82</sup> Este estudio incluyó pocas muestras negativas por serología, así que la especificidad del ensayo no se pudo determinar. Un ensayo de este tipo tal vez sería útil para el tamizado contra *T. cruzi* en los bancos de sangre en aquellas áreas en las cuales esta infección es

En la amibiasis, el diagnóstico coproparasitológico no distingue la infección por *Entamoeba dispar*, cepa no patógena, de la infección por *Entamoeba histolytica*. Dos secuencias repetidas presentes en ADN extracromosomal han demostrado ser útiles en ensayos con hibridación por Southern blot para diferenciar ADN de cepas *E. dispar* de *E. histolytica*.<sup>83,84</sup> Recientemente, ensa-

yos de PCR basados en la amplificación de estos fragmentos, han sido probados en ensayos de campo. Acuña-Soto y colaboradores encontraron que su ensayo de PCR tenía una sensibilidad de 96% y una especificidad de 98% para detección de *E. histolytica* en muestras clínicas.<sup>85</sup> En estudios con muestras de materia fecal y realizados mediante el empleo de secuencias de genes de RNA ribosomal específicas para ambas especies, nuestro grupo recientemente ha demostrado la presencia de infección mixta con *E. h* y *E. d.* en niños con infección asintomática.<sup>86</sup> Resultados de estudios recientes utilizando sondas de DNA para genes que codifican para la proteína rica en serina (SRP) y para quitinasa, han permitido a Samuelson y colaboradores proponer un novedoso sistema de clasificación de cepas de *E. histolytica* y *E. dispar* provenientes de diferentes partes del mundo.<sup>87</sup>

#### Detección de resistencia a antibióticos

Uno de los usos posibles de las nuevas técnicas de diagnóstico molecular que menos se ha estudiado, es la detección de los genes responsables de la resistencia a los antibióticos. Cabe pensar que en un futuro existan métodos que permitan, en un solo ensayo, identificar un patógeno y definir su patrón de susceptibilidad. Esto es especialmente factible en aquellos casos en los que mutaciones en un solo gen bien caracterizado, son responsables de conferir resistencia a un antibiótico particular. Tal es el caso del gen *mecA* que confiere resistencia a la meticilina en el estafilococo.<sup>88</sup>

La resistencia de *H. influenzae* a ampicilina se ha asociado con la producción de una enzima denominada betalactamasa. Esta enzima puede ser detectada por varios métodos incluyendo PCR. En un estudio reciente, utilizando la técnica de PCR con sondas iniciadoras provenientes de pBR322, se pudo documentar que las betalactamasas en cepas de *H. influenzae* resistentes a ampicilina son codificadas por el gen para betalactamasa tipo TEM.<sup>89</sup>

Con base en estudios preliminares donde se analizaron plásmidos de cepas de *Klebsiella pneumoniae* asociadas a infecciones nosocomiales en dos instituciones,<sup>90</sup> actualmente estamos desa-

rollando un trabajo utilizando PCR para estudiar la epidemiología molecular de la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a cefalosporinas de tercera generación. También se han descrito dos ensayos para la detección de cepas de *P. falciparum* resistentes a la pirimetamina.<sup>91</sup> Existen muchos otros ejemplos en los cuales el análisis de genes de resistencia por métodos moleculares pronto comenzará a tener aplicación clínica.

#### Conclusiones

La lista de usos de la biología molecular para el diagnóstico, evaluación de progresión o respuesta a tratamiento de enfermedades infecciosas es extensa y cada día se le agregan nuevas pruebas e indicaciones. Dada la rapidez y sensibilidad de estos métodos, es muy probable que dentro de pocos años estas pruebas sean de uso común en los laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, en un país como el nuestro, en el cual los recursos son limitados, el uso de estas tecnologías tiene mayor sentido en los laboratorios regionales de referencia en los cuales se maneja un gran número de muestras y se pueda justificar la inversión de equipo y reactivos que esto implica.<sup>92</sup>

Además de asegurar la formación de recursos humanos altamente calificados y adiestrados en la teoría y la práctica de la biología molecular, nuestro país requiere de un análisis que tome en cuenta las necesidades más apremiantes en cuanto al diagnóstico y a la investigación, y que a su vez permita identificar aquellas enfermedades infecciosas, en las cuales la biología molecular prometa tener la mayor utilidad con relación al costo beneficio.

#### Referencias

1. Schoolnik G. Application and transfer of technology to the nations of the south. Biotechnology and the control of childhood enteric infections. *Infect Dis Clin North Am.* 1991, 5:265-275.
2. Martínez-Palomo A, Sepúlveda J. Biomedical research in Latin America: old and new challenges. En: Bloom BR, Cerami A, de. *Biomedical Science and the third world.* New York Academy of Sciences, 1989, 36-44.
3. Mullis KB, Faulstich FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction *Methods Enzymol.* 1987, 155:335-350.

4. Saiki RK, Gelfand DH, **Stoffel S**, et al. Primer-dependent enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-491.
5. Meyers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a Thermus thermophilus DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991;30:7661-7666.
6. Wu DY, Ugozoli L, Pal **BK**, et al. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol*. 1991;10: 233-238.
7. Boom R, Sol CJA, Salimans MM et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990;28:495-503.
8. Koksaka H, Taniguchi A, Richman D D, Carson DA. Microtiter format gene quantification by covalent capture of competitive PCR products: application to HIV-1 detection. *Nuc Ac Res*. 1993;21:3469-3472.
9. Friedhof P, Hahn M, Wolfes J, Pingoud A. Quantitative polymerase chain reaction with oligodeoxynucleotide ligation assay/enzyme-linked immunosorbent assay detection. *Analyt Biochem*. 1993;215: 9-16.
10. Kawai S, **Maekawajiri S, Yamane A**. A simple method of detecting amplified DNA with immobilized probes on microtiter wells. *Analyt Biochem*. 1993, 209:63-69.
11. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, et al. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl Acad Sci, U:S:A*: 87,1874-1878.
12. Kievits T, van Gemen B, van **Strijp D**, et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J of Virological methods*. 1991; 35: 273-286.
13. Fahy E, Kwoh DY, Gingeras TR. Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Applic*. 1991; 1:25-33.
14. Birkenmeyer LG and Mushahwar IK. DNA probe amplification methods. *J of Virological Methods*. 1991; 35: 117-126.
15. Urdea MS, Horn T, **Fultz T**, et al. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1991; 24:197-200.
16. Urdea MS, Running, JA, Horn T, et al. A novel method for the rapid detection of specific nucleotide sequences in crude biological samples without blotting or radioactivity: Application to the analysis of hepatitis B virus in human serum. *Gene* 1987; 61: 253-264.
17. Hendricks, DA, Stowe, BJ, Hoo, **B.S**, et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am J of Clin Path*. 1995. 104 (5): 537-546.
18. Longo MC, Berninger **MS, Hartley JL**. Use of uracil DNA glycosylate to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93: 125-128.
19. **Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW, Hearst JE, Isaacs ST**. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 1991, 19:99-107.
20. Espy MJ, Smith TF, Persing DH. Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J. Clin Microbiol* 1993; 31: 2361-65.
21. **Gilliland, G, Perrin, S, y H R, Brunn**. 1990. Competitive PCR for quantitation of mRNA, p60-69. En innis, MA, Geifand DH, Sininsky, J J y White, T.J. (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego.
22. Piatak M, Luk K, Williams **B, Lifson J D**. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques*. 1993; 14: 70-75.
23. Jurrians S, Dekker J T, de Ronde A. HIV-1 viral DNA load in peripheral blood mononuclear cells from seroconverters and long term infected individuals. *AIDS*. 1992; 6:635-641.
24. Hendericks DA, Stowe BJ, Hoo q S, et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am J of Clin. Path*. 1995; 104 (5); 537-546.
25. **Perillo RP**. Interferon therapy for chronic type B hepatitis: the promise comes of age. *Gastroenterology* 1989; 96: 532-535.
26. Cartwright C, Nelson, NA, **Gill VJ**. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 1634-1638
27. Hoimes, AR, **Cannon RD, Sheperd MG** et al. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 228-231.
28. **Tjhie JHT, van Kupperveld FJM, Roodsendaal R, et al**. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 11-16.
29. Zhongming, L, Jansen DL, **Finn TM, et al**. Identifications of *Bordetella pertussis* infections by shared - primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 783-789.
30. Spreadbury C, Holden D, Aufavre-Brown A, et al. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1993; 31:615-21.
31. Ho DD, Neuman AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-126.
32. Wei, X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infections. *Nature*. 1995; 373: 117-122.
33. Michael NL, Vahey M, **Burke DS**, et al. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease. *J Virol*. 1992; 66: 310-316.
34. Pantaleo G, **Graziosi C, Demarest JM, et al**. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinical latency stage of disease. *Nature*. 1993; 362: 355-358.
35. Embretson J, Zupancic M, Ribas **JL, et al**. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period AIDS. *Nature*. 1993; 362: 359-362.

36. Mellors JW, Kingsley LA, **Rinaldo CR Jr.** et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predict outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122: 573-579.
37. Mellors JW, Reinhold CR Jr., **Gupta D** et al. Prognosis in HIV 1 infection predicted by the quantitation of virus in plasma. *Science* 1996; 272: (5265) 1167-1170.
38. **O'Brien WA**, Hartigan PM, Martin D, et al. Changes in plasmas HIV-1 RNA and CD4+ lymphocytes count relative to treatment and progression to AIDS. *N Engl J Med* 1996; 334: 426-31.
39. **Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM** et al. Antiretroviral therapy for HIV in 1996. *JAMA* 1996; 276: 146-154.
40. Dickover, RE, **Donovan RM**, Goldstein E, Huth RG, Carlson JR. Quantification of human immunodeficiency virus DNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2130-3.
41. Mulder J, **McKinney N, Christopherson C** et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type I in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Micro* 1994; 32: 292-300.
42. Cao Y, Ho D D, Todd J et al. Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1995, 11: 353-361.
43. Pacht C, Todd J A, Kern D G, et al. Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay. *J AIDS* 1995; 8: 446-454.
44. Van Gemen B, Van Beuningen R, Nabbe A, et al. A one tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labeled probes. *J Virological Methods* 1994; 49: 157-168.
45. Kenny C, Parkin J, Underhill G, et al. HIV antigen testing. *Lancet* 1987; 1:565-6.
46. **Falloon J**, Eddy J, Weiner L, Pizzo P. Human immunodeficiency virus infection in children. *J Pediatr*. 1989; 114: 1-30.
47. Patru A, Denphy MG, Azimi P, et al. Reliability of polymerase chain reaction in the detection of human immunodeficiency virus infection in children. *Pediatr Infect Dis J*. 1992; 11:30-3.
48. Saag MS, Crain MJ, Decker WD, et al. High-level viremia in adults and children infected with human immunodeficiency virus: relation to disease stage and CD4-lymphocyte levels. *J Infect Dis*. 1991; 164: 72-80.
49. **Donovan RM**, Bush CE, Smereck SM, Moore E, Cohen F and Saravolatz LD. Antiretroviral therapy is associated with a decrease in unintegrated HIV-1 DNA in Pediatric Patients. *J of Acquir Immun Defic Syndr* 1994; 7: 1237-1241.
50. **Loeffelholz MJ**, Lewinski CA, **Silver SR** et al. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Micro* 1992; 30: 2847-2851.
51. Jaschek G, Gaydos CA, Welsh LE, **Quinn TC**. Direct detection of Chlamydia trachomatis in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay. *J Clin Micro* 1993; 31: 1209-1212.
52. Chernesky MA, Jang D, Lee H, et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection in men and women by testing first-void urine by ligase chain reaction. *J Clin Micro* 1994; 32:2682-2685.
53. Lee HH, Chernesky, Schacter J, et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis infection in men by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet* 1995; 345: 213-216.
54. Van Doornum GJJ, Buimer M, Prins Metal. Detection of Chlamydia trachomatis infection in urine samples from men and women by ligase chain reaction. *J Clin Micro* 1995; 33: 2042-2047.
55. Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *JID* 1995; 171: 857-63.
56. Raviglione, MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: Morbidity and mortality of worldwide epidemic. *JAMA*. 1995; 273: 220-226.
57. Snider DE, Rieder HL, Combs D, et al. Tuberculosis in Children. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7: 2710278.
58. **Starke JR, Taylor-Wats KT**. Tuberculosis in the pediatric population of Houson, Texas. *Pediatrics*. 1969; 84: 28-35.
59. Thierry D, **Brisson-Noel A**, Vincent-Levy-Fr ebault V, Nguyen S, Guesdon J, Gicquel, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110 and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2668-2673.
60. Sjobring U, Mecklenburg M, Andersen A B, Miorner H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* *J Clin Microbiol*. 1990; 28: 2200-2204.
61. Del Portillo P, **Murillo LA**, Patarroyo M E. Amplification of a species specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 2163-2168.
62. Clarridge JE, Shawar RM, **Shinnick TM** and Plikaytis RB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detecting of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriological laboratory. *J Clin. Microbiol*. 1993; 31: 2049-2056.
63. Eisenach K D, **Sifford M D**, Cave M D, Bates J H, Crawford J T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-1163.
64. Kolk, AHJ, **Schuitema, ARJ**, Kuijper, S et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbio*. 1990; 30: 2567-2575.
65. Nolte FS, Metchock B, **McGowan JE** et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 1777-1782.
66. Noordhoek GT, Kolk A J H, Bjune, G et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 277-284.

67. Jonas V, Alden MJ, Curry JL, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Micro* 1993;24:10-2416.
68. Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR microwell plate hybridization method (Amplicor *Mycobacterium*) for direct detection of *Mycobacterium*. *J Clin Micro* 1996;34:130-133.
69. Carpentier E, Drouillard B, Dailoux M, et al. Diagnosis of tuberculosis by amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. *J Clin Micro* 1995;33:3106-3110.
70. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis of tuberculosis by nucleic acid amplification methods applied to clinical specimens. *MMWR*. 1993;42:686.
71. Fries JWU, Patel RJ, Piessens WF, Wirth DF et al. Genus and species-specific DNA probes to identify *Mycobacterium* using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1990;4:87-105.
72. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Genprobe Accuprobes to identify *Mycobacterium* complex, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii* directly from BACTECTB broth. *J of Clin Micro*. 1994;32:2995-8.
73. Kolk AH J, Noordhoek GT, De Leew O, Kuiper S, Van Embden J DA. *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. *J Clin Microbiol* 1994;32:1354-1356.
74. De Wit, D, Steyn, L, Shoemaker S, y Sogin, M. Simple method for production of internal control DNA for *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction assays. *J Clin Microbiol*. 1993;31:2204-207.
75. Smith KC, Starke JR, Eisenach K, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics*. 97 (2) 155-160.
76. Mancao MY, Nolte FS, Nahmias AJ. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13:154-156.
77. Donald PR, Victor TC, Joraan AM et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis meningitis. *Scan J Infect Dis*. 1993;25:613-617.
78. Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;337:5-7.
79. Weiss JB. DNA probes and PCR for the diagnosis of parasitic infections. *Clin Micro Rev*. 1995;8:113-130.
80. Barkey RH, Banchongakorn T, Courval JM, et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;46:416-426.
81. López MR, Inga M, Cangalaya J, et al. Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*. 49:3348-356.
82. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, et al. Detection of *Trypanosoma Cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. 1993. 31:2421-2426.
83. Bracha R, Diamond LS, Ackers JP et al. Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1990. 28:680-684.
84. Grafinkel, LI, Giladi M, Huber M, et al. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun* 1989;57:926-931.
85. Acuña-Soto, R, Samuelson J, De Girolami P, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48:58-70.
86. Newton-Sánchez O, Sturm-Ramírez K, Romero Zamora J, Santos JI, Samuelson J. High rate of occult infection with *Entamoeba histolytica* among non-dysenteric Mexican children. *Arch Med Res* 1997;28:8311-S313.
87. Samuelson J, Caplivski D, Sturm-Ramírez K, et al. A proposal for a molecular biologic system for classifying isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 1997;28:S274-S275.
88. Ubukata, K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A. Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 1992;30:1728-1733.
89. Espinosa L, Rocha C, Gayosso C, et al. Detection of betalactamasa tipo TEM en cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes a ampicilina utilizando la reacción de polimerasa en cadena (PCR) *Rev. Lat-Am Microbiol*. 1993;35:87-90.
90. Espinosa L, Ceja V, Montañez C and Santos J I. Comparative analysis of plasmids from nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from two hospitals *Arch Med Res* 1994;25:321-324.
91. Sweet-Cordero A, Santos Preciado JI. Utilidad de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la investigación y el diagnóstico clínico en pediatría. *Bold. Med Hosp Infant Mex*. 1993;50:73-78.
92. Zoig JW, Chen GX y Plitt JR. Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1990;39:257-266.