
Patología Molecular y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas

Manuel Figueroa, PhD. y Suraiya Rasheed, Ph. D.¹*

RESUMEN

Los autores revisan y describe métodos moleculares para la detección de agentes etiológicos o secuencias genéticas involucradas en la patogénesis de varias enfermedades. Hay sondas moleculares ya disponibles para el diagnóstico rápido de enfermedades causadas por un gran número de virus, bacterias, hongos, espiroquetas, rickettsias y otros agentes infecciosos. Dado que las sondas de ácidos nucleicos pueden distinguir muy pequeñas diferencias indicativas de mutaciones genéticas o alteraciones, se pueden desarrollar sondas específicas aun para aquellas enfermedades con agentes etiológicos desconocidos. Además usando estas técnicas se han identificado cepas a medicamentos y cepas patógenas asociadas a epidemias en areas ampliamente separadas de un país o de una ciudad.

Así pues la sensibilidad y la especificidad de los métodos de detección molecular usando sondas radioactivas y no radioactivas están a tal punto que se pueden aplicar a especímenes clínicos para el diagnóstico rápido e identificación de agentes etiológicos responsables de la patogenia de una variedad de

enfermedades. (Palabras Claves: Sondas Moleculares; Diagnóstico Patológico; virus de Inmunodeficiencia Humana, SIDA).

INTRODUCCIÓN

El manejo médico ó prevención de una enfermedad depende primordialmente de un diagnóstico clínico certero. Tradicionalmente la mayor parte de las enfermedades infecciosas se han diagnosticado por inmuno-ensayos o técnicas histoquímicas o de cultivo. Aunque estos exámenes son críticos para el diagnóstico de las infecciones, las respuestas inmunes individuales varían, y en muchos casos la detección de un anticuerpo o un antígeno dependen de la cantidad o "carga" del agente infeccioso presente en un tejido específico. Este fenómeno es particularmente relevante en las infecciones con retrovirus humanos.

Los virus de inmunodeficiencia humana tipos I y II (VIH-I y VIH-2) y los virus de leucemia de células T humanas tipos I y II (VLTH-I y VLTH-II) han sido asociados etiológicamente al S I D A y a la leucemia de células-T en adultos y la leucemia de células vellosas, respectivamente (1-3). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual estos virus causan una variedad de enfermedades incluyendo síntomas neurológicos y cáncer, no es bien comprendido. Aunque la exposición al VIH y VLTH-1 resulta en la producción de anticuerpos, estos no se detectan sino hasta después de varios meses y en algunos casos, hasta después de un año (4,5).

Departamento de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras y Laboratorio de Oncología Viral e Investigación en SIDA, Universidad de California del Sur, Escuela de Medicina, Los Angeles, California.

Además a menos que el individuo sea expuesto a grandes dosis de virus, como es el caso de los que reciben transfusiones sanguíneas, los antígenos virales no se detectan basta que el virus ha tenido oportunidad de replicarse lo suficiente; para ese tiempo el individuo ha comenzado a desarrollar los síntomas iniciales. Debido a que los retrovirus se integran en el DNA de los cromosomas del huésped estos virus pueden causar infecciones persistentes latentes y escapar la detección por los métodos convencionales de antígeno-anticuerpo.

Los grandes avances tecnológicos en área de DNA recombinante; clonaje, secuenciación y amplificación de genes; mareaje con métodos no-isotópicos y otros métodos de alta sensibilidad para la detección de genes han facilitado el uso de sondas de DNA ó RN A en todas las áreas del diagnóstico e investigación básica y clínica. Así, ahora son factibles pruebas exactas y rápidas para la detección de una amplia variedad de agentes infecciosos, anormalidades genéticas (7), cáncer (2,8-10), determinación de paternidad (11-12) y medicina forense (13).

Debido a que las sondas moleculares son hechas de moléculas altamente específicas, se vuelven herramientas notables para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de terapias medicamentosas para muchas enfermedades. Además, mediante el uso de sondas moleculares la fuente de una epidemia puede identificarse de una manera más exacta que por otros métodos convencionales.

En este artículo damos un vistazo a los métodos que nosotros y otros han desarrollado para la identificación y cuantificación de varios agentes infecciosos, incluyendo los retro virus humanos. las ventajas y limitaciones de las técnicas moleculares en el diagnóstico viral y de otras enfermedades infecciosas.

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR

Preparación de las muestras clínicas

Aunque es conveniente el uso de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en la mayor parte de los individuos, también se pueden usar con éxito biopsias y tejidos de autopsia ya sea frescos, congelados o fijados para los diferentes métodos de detección molecular. Una de las ventajas en cuanto al

uso de CMSP para las enfermedades transmitidas por la sangre es que se puede preparar suficiente cantidad de RNA o DNA total de las células y además éstas pueden adherirse a láminas o cubre objetos para la hibridización in situ.

En general, la mayor parte de las muestras clínicas fijadas para examen histológico en varios fijadores biológicos (fijador de Boin, fijador de Carnoy, formalina 10%, paraformaldehído, acetona, metanol, etc.) pueden usarse para el análisis del DNA. Sin embargo, las muestras fijadas en soluciones que contienen mercurio, tales como Zenker ó B-5, no son adecuadas para la reacción de polimerasa en cadena (RPC), hibridización in situ y otras técnicas moleculares sofisticadas. Para la hibridización in situ de células y tejidos congelados nuestro laboratorio usa paraformaldehído al 2% con 0.1 M de lisina en solución salina buferada con fosfatos (SBF). Mientras los tejidos congelados ó fijados se pueden usar para la preparación de DNA solo las muestras frescas y congeladas rápidamente en nitrógeno líquido a -85°C se recomiendan para el análisis de RNA. Así pues, el criterio importante para el uso de fijadores es el de preservar la morfología celular y la integridad del DNA y RNA.

Extracción del DNA y RNA

Hemos establecido un procedimiento sencillo para la preparación de DNA de plásmidos el cual produce alta calidad de DNA purificado para la preparación de sondas ("probes") (7). Una ventaja de esta técnica es que remueve muchos contaminantes del DNA que pudieran interferir con la digestión por endonucleasas de restricción y otros procedimientos usados en la preparación de sondas. Brevemente, después de la lisis alcalina (Na OH 0.2 N, SDS 1%) de la bacteria, el DNA se precipita en múltiples pasos en presencia de acetato de amonio (2.5 M/ pH 7.6). El método es rápido, barato y no usa fenol ó cloroformo.

Nuestro laboratorio también ha adaptado un procedimiento simplificado para la preparación de DNA de alto peso molecular de muestras clínicas usando condiciones de alta salinidad para quitar las proteínas. El procedimiento elimina la necesidad de usar fenol-cloroformo. Brevemente, se lisan las células y tejidos en presencia de Tris H Cl 10 m M Na Cl 400 m M, EDTA-Na 2 m M, SDS 1% y 50mg/ml de proteínaasa K a 37°C La concentración de proteínaasa K se aumenta a 100 mg/ ml para los tejidos difíciles de digerir. Después de la lisis celular, se añade Na Cl 6 M y los restos de membranas se remueven por centrifugación.

Finalmente, el DNA se precipita mediante la adición de 2 volúmenes de etanol en presencia de acetato de amonio 0.2 M a-20°C Este método es particularmente útil para aislar DNA de un gran número de muestras y de pequeños volúmenes de sangre de infantes, biopsias, aspiraciones con aguja pequeña de fluido amniótico ó cerebro-espinal conteniendo muy pocas células(12,13). Aunque este DNA es suficientemente limpio para la digestión con enzimas de restricción y otros procedimientos usados en el diagnóstico molecular de muestras clínicas, puede requerir mayor purificación por medio de la extracción con fenol-el oro formo para pruebas sofisticadas.

Para el aislamiento del RNA de células y tejidos, se usa un tratamiento con isotiocianato de guanidina concentrado (SM). Este procedimiento es sencillo porque, mientras la sal de guanidinio rápidamente remueve las proteínas del RNA además desnaturaliza la ribonucleasa, enzima que degrada el RNA con rapidez, {15}. Este RNA puede hibridizarse directamente en la misma solución usada para la preparación de la muestra. En la mayor parte de los casos no es necesaria la

separación en columnas de Polyd-T. Sin embargo, estas columnas están disponibles comercialmente y pueden usarse si se desea RNA de alta pureza.

Selección de Sondas y Estrategias de Marcado

Sin importar el sistema de marcado y detección usado, la sonda se prepara del DN A ó RNA específico para una secuencia genética altamente conservada en el agente infeccioso en particular, ó que representa una mutación, sustitución, ó amplificación de un gene celular normal en una malformación genética.

Además, cantidades ilimitadas de sondas pueden producirse de fragmentos de DNA altamente específicos y purificados mediante el clonage de DNA ó c-DNA (DNA complementario) hecho a partir de transcripciones específicas de RNA en un plásmido, que es luego multiplicado en un vector bacteriano (16-19). Por otro lado, hay sondas de DNA comercialmente disponibles para las principales áreas del diagnóstico clínico (Cuadros 1 y 2).

CUADRO No. 1.

SONDAS MOLECULARES EN LAS INFECCIONES VIRALES: EJEMPLOS SELECCIONADOS

PATOGENO	SONDA	MARCA	HIBRIDIZACION	REFERENCIAS
VIRUS DE INMUNO-DEFICIENCIA	GAG-POL, Gen RF, Región IF; DNA OLIGONUCLEOTIDO GEN RF, REGION IF.	NOISOTOPICA, 32P 35S	DNA-RNA; DNA-DNA IN SITU: RNA-RNA PCR (DNA ó RNA).	3,6,16,19 22, 79-85
LEUCEMIA DE CELULAS T	DNA, OLIGONUCLEOTIDO	32P	DOT BLOT, SOUTHERN BLOT PCR	2, 3, 75, 86-88
CITOMEGALOVIRUS	DNA fragmento D	32P, 14C BIOTINA	DOT BLOT, IN SITU	49-52
ROTAVIRUS	DNA, OLIGONUCLEOTIDOS	P-AL, 32 P	DOT BLOT, P C R	37-39
PAPILOMAVIRUS	DNA DE CADA UNO DE 4 TIPOS, FRAGMENTOS BAM HI CLONADOS	BIOTINA 32P	DOT BLOT, PCR	55-58
VIRUS EPSTEIN-BARR	FRAGMENTOS DE DNA CLONADOS	32P	DOT BLOT, IN SITU, PCR	35-53
VIRUS DE HEPATITIS B	DNA CLONADO	BIOTINA QUEMILUMINIS- CENTE, 32P	IN SITU, DNA-DNA	25,47,48
VIRUS HERPES SIMPLEX	DNA FRAGMENTOS BAM-HIND III	BIOTINA	DNA-RNA, SLOT BLOT	49
ADENOVIRUS	DNA FRAGMENTOS BAM-HIND III	32P	DOT BLOT	69, 70
ENTEROVIRUS	DNA OLIGONUCLEOTIDO	NO-ISOTOPICO 32 P	SLOT BLOT SOUTHERN BLOT	54 59

CUADRO No. 2

SONDAS MOLECULARES USADAS EN LA DETECCION DE INFECCIONES
MICROBIANAS Y PARASITICAS: CASOS SELECCIONADOS

PATOGENO	SONDA	MARCA	HIBRIDIZACION	REFERENCIA
Salmonella	DNA, oligonucleótido	P-Alc DNA-DNA	Dot-blot	76
Shigella	DNA, fragmento EcoR1	Biotina Dot-blot,	PCR	44
Actinobacillus	DNA	32p	Southern blot	91
Bacteroides	DNA	32p 35S	In situ	91
E. coli	DNA, oligonucleótido	32p, P-Alc	Dot blot, PCR	40-44
S. aureus	DNA, oligonucleótido	32p, no-isotópico	PCR, DNA	77,78
Campylobacter	DNA	P-Alc	DNA-DNA	45
Clostridium	c-DNA, rRNA, oligonucleotido	32p	Dot-DNA	46
Mycoplasma	DNA, fragmentos Hinbd III	32p	Dot blot, PCR	66
Haemophilus	DNA	32p,	Biotina Dot blot, DNA	72
Mycobacterium	DNA, Mbo-I	32p	Dot blot	62-64
Legionella	c-DNA, oligonucleótido	135I	DNA-DNA	71
Chlamydia	c-DNA, oligonucleótido	Ester de acridinio	DNA-DNA, PCR	62,92
Neisseria	c-DNA, oligonucleótido	Ester de acridinio	DNA-DNA	60
Pseudomonas	DNA	Biotina	DNA-DNA	74
Trypanosoma	DNA	32p	DNA	90
Plasmodium	Oligonucleótido	32p	DNA	89
Candida	DNA	32p	DNA-DNA	73
Rickettsia	DNA	32p	PCR	67

Tanto las sondas radioactivas y no radioactivas de DNA pueden prepararse usando d-CTP ó d-ATP marcados y añadiendo los cuatro nucleótidos (d-NTP) y la DNA polimerasa I (0.5 a 1 unidad/ml). Aunque se pueden preparar sondas de DNA por el método de "Nick translation", el cual produce pequeñísimos cortes mediante al tratamiento con DNA-sa al mismo tiempo que marca el DNA (20) la eficiencia del mareaje es baja y puede inhibirse por contaminantes presentes en el DNA o por el tiempo y temperatura de la síntesis. Un procedimiento más eficiente es el uso de oligonucleótidos que pueden servir como iniciadores al azar ("random primers", 6 a 12 nucleótidos) de la síntesis de DNA dirigida por la polimerasa sobre el patrón de DNA de cadena sencilla. Los iniciadores azarizados del DNA de timo de ternero pueden comprarse de varias fuentes comerciales (Pharmacia, Boehringer Manheim, British Biotechnology Ltd., etc) ó pueden prepararse en un sintetizador automático de DNA. Alternativamente la digestión con DNAsa I del DNA de timo de ternero o de esperma de salmón también producirá pequeñas fragmentos de DNA de cadena sencilla de acuerdo al protocolo descrito por Feinberg y Vogelstein (21). Estas sondas son de alta actividad específica porque una gran proporción de los d-NTP radiomarcados se incorporan al azar en el DNA. El RNA puede ser marcado in vitro, sin embargo, se producen excelentes sondas de RNA usando vectores plásmidos (pSP64- ó p-SP65) con promotores de transcripción usando 35S radioactivo o

bien d-UTP marcado con biotina en presencia de los otros tres ribonucleótidos (Fig.1) (15-22)

Con la invención de sintetizadores de DNA es posible ahora producir pequeñas cadenas únicas de DNA (oligonucleótidos) para casi cualquier secuencia conocida. El uso de sondas de oligonucleótidos aumenta la sensibilidad de detección porque las sondas hibridizan en una secuencia específica pequeña con mayor eficiencia que los fragmentos grandes de DNA clonados en plásmidos.

Se pueden preparar sondas moleculares de alta actividad específica marcando con un radioisótopo, tal como 32P, 125-I y 35S, fragmentos de DNA ó RNA. Los oligonucleótidos también se pueden marcar con isótopos radioactivos en la cola 5' de la cadena. Sondas no radioactivas se pueden preparar usando la dioxinucleotidil transferasa terminal (T d T) (18,23,24).

Las sondas marcadas de DNA ó RNA se purifican removiendo los nucleótidos no incorporados por filtración en gel a través de columnas cromatográficas de Sefadex G-50, comercialmente disponibles, ó por extracción con fenol y cloroformo seguida de la precipitación por etanol (18). Sin embargo, las sondas biotiniladas no son tratadas por fenol porque éste extrae la biotina la cual es retenida en la interfase de agua fenol

y así se pierde la marca reduciendo las señales de hibridización.

También se han desarrollado métodos sensibles de detección por una variedad de procedimientos moleculares que usan sondas quemiluminiscentes y equipos de luminometría, sin embargo, su uso en el laboratorio clínico está todavía lejano.

Hibridización Molecular y Sistemas de Detección

Los métodos básicos de hibridación de RNA y DNA en tejidos usando sondas específicas de DNA ó RNA son como sigue:

- 1) Hibridización de DNA ó RNA de los tejidos con sondas de DNA ó RNA en solución.
- 2) Hibridización de DNA ó RNA en membranas de nitrocelulosa o en membranas de nylon después de la electroforésis en gel y transferencia a una membrana ("Southern blot" para DNA y "Northern blot" para RNA) ó bien directamente mediante la hibridización llamada "dot blot" o "slot blot" (manchas en círculo o en línea).
- 3) Hibridización directamente en las células y tejidos por el método de hibridización *in situ*.

La hibridización de DNA en solución ó en filtro de nitrocelulosa se lleva a cabo en una mezcla que contiene sulfato de dextrano 10%, 4x de solución estandar de citrato (0.15M (1XSSC=NaCl 0.15M y citrato de sodio 0.015 M), 200 mg de DNA de esperma de salmón, formamida desionizada 45%, fosfato disódico mN y la sonda previamente desnaturalizada (18). Es importante notar que no se deben usar condiciones alcalinas (NaOH) para desnaturalizar sondas biotiniladas porque el NaOH rompe la biotina del DNA.

La hibridización o sea la unión de DNA ó RNA complementaria se lleva a cabo a 42°C por 16 a 24 horas con agitación suave. Se hacen lavados de poshibridización en varias diluciones sucesivas de SSC (X2 y X, 0.2 X 0.1) en sulfato de dodecilo (SDS) al 0.1% por 10-15 minutos cada lavado.

En general, las condiciones de hibridización que se usan para el DNA ó RNA en los tejidos con varios tipos de sonda son similares. Sin embargo se hacen modificaciones para aumentar la especificidad y sensibilidad de estas pruebas y depende de las sondas y

marcas usadas así como de las condiciones de la muestra. El tiempo, la temperatura, la concentración de sales y formamida se modifican de acuerdo con la composición de bases de la sonda usada y la complejidad de la secuencia detectada (18). Además se hace una prehibridización de las células ó membranas que contienen los ácidos nucleicos en la misma forma que la hibridización, nada más que por un período corto, usualmente 1-3 horas.

Si se usa una sonda radioactiva, se detectan las moléculas hibridizadas por medio de una película o emulsión fotográfica sensible a los rayos X (autoradiografía). En el caso de las sondas no radioactivas hay sistemas de detección colorimétrica o fluorométrica (26,27). De éstas, la fosfatasa alcalina (24), biotina (28) y la digoxigenina (26) se ha visto que son eficientes para el marcado *in vitro*. La excitación fotoquímica de los ésteres de acridinio por la luz a una determinada longitud de onda seguida por emisión de luz a otra longitud también es útil, porque la luz emitida por la reacción quemiluminiscente es capturada por un fotomultiplicador y convertida en una señal digital (25).

Detección de Secuencias Genéticas por la Técnica Amplificación de Genes

Cuando no se tienen cantidades adecuadas de DNA ó RNA para hacer la prueba ó cuando el número de copias de la secuencia genética es poca, se puede usar una nueva técnica llamada reacción de polimerasa en cadena (RPC) la cual amplifica secuencias genéticas altamente conservadas (DNA ó RNA) de un virus, otros microorganismos, o del DNA ó RNA de la célula huésped. Así las secuencias de ácidos nucleicos que no se detectan por los métodos de hibridización "Southern blot" y "Dot blot" o aquellas presentes en extremadamente pequeñas cantidades de DNA obtenida de manchas de sangre ó semen, frotis de sangre en láminas, ó de tejidos parcialmente degradados (por ejemplo de autopsias o situaciones en medicina forense) pueden amplificarse por técnicas de RPC y luego detectarse mediante sondas específicas en la hibridización molecular.

Reacción de Polimerasa en Cadena

La amplificación del DNA por RPC ó bien del cDNA para amplificación de secuencias de RNA, se lleva a cabo mediante la unión de iniciadores o "primers" específicos tanto de la cadena positiva como de la

negativa del DNA previamente desdoblado. Una primera copia de DNA se hace por extensión del "primer" a derecha e izquierda respectivamente con una enzima específica, la DNA polimerasa. La mezcla-reacción contiene 2 unidades de DNA polimerasa termoestable (taq) en presencia de los cuatro nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), trisHCL, 100 mM, pH8; KCl, 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM y gelatina al 0.01%.

La amplificación se lleva a cabo en 30-50 ciclos de unión-extensión-desdoblamiento usando un calentador cíclico automático de la casa Cetus -Perkin Elmer (2,29,30). El producto de DNA amplificado se identifica por su tendencia a unirse a las sondas de oligonucleótidos radioactivos y se detecta por electroforesis en gel y autoradiografía. El producto de RPC también se puede identificar por hibridización tipo "dot blot" usando sondas radioactivas ó las no- isotópicas.

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE MUESTRAS CLINCAS POR RPC

La técnica RPC es tan poderosa que ha sido usado en casi todos las áreas de la biología molecular tanto en la investigación como en el laboratorio-clínico. El método RPC para amplificación del DNA se ha usado con éxito en la identificación de varios virus, bacterias y otros microorganismos; para el tamizado de sangre y sus productos y para la detección de genes asociados a enfermedades genéticas, transformaciones neoplásticas y disfunciones inmunes. Algunos ejemplos específicos de la utilidad de esta prueba en un laboratorio de enfermedades infecciosas se discuten en la sección siguiente.

APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

Patología Diagnóstica e Investigación

Desde la primera demostración de la transferencia permanente del DNA a filtros de nitrocelulosa, las pruebas moleculares de ácidos nucleicos se han vuelto una parte integral de la mayor parte de los proyectos de investigación básica y clínica (1). Los progresos en el DNA recombinante, clonaje, secuenciación y otras técnicas moleculares han permitido a los científicos identificar genes y producto proteicos y comprender rutas moleculares en la progresión de la enfermedad,

incluyendo el cáncer y las enfermedades genéticas para las cuales no se han definido agentes etiológicos (32-36.)

Un diagnóstico precoz durante el desarrollo fetal es de importancia primordial (33) y varias defectos hereditarios se pueden detectar en células fetales obtenidas del líquido amniótico. Además en virtud de su inherente confiabilidad y rapidez de detección las sondas de DNA pueden volverse herramientas importantes en el diagnóstico fetal de enfermedades genéticas para las cuales los genes específicos no han sido aislados. Las técnicas moleculares también han ayudado a la identificación de marcadores de translocaciones cromosomales para el diagnóstico de linfomas humanos y otros tumores (8,36).

Así en gran número de enfermedades genéticas, desórdenes metabólicos y tipos de cáncer que antes se diagnosticaban en base a defectos cromosómicos, historia familiar, y productos anormales de metabolismo, ahora se diagnostican usando sondas moleculares específicas.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Se han desarrollado pruebas diagnósticas en los laboratorios de enfermedades infecciosas usando antígenos, anticuerpos, y técnicas de cultivo. Actualmente, la mayor parte de las enfermedades infecciosas se diagnostican usando sondas moleculares (DNA, RNA, ó proteínas recombinantes); esto incluye las diarreas asociadas a infecciones por rotavirus (37-39) *Escherichia coli* entero toxigénica (40-44), *Campylobacter* (45) *Shigella* (44) *Clostridium* 46, y *Giardia* (43). La comparación de varios inmunoensayos con sondas de DNA para la detección de rotavirus en muestras clínicas indicó que los resultados con sondas de DNA son superiores a los resultados con otras pruebas (37-39). El examen de las muestras clínicas por RPC también se encontró ser útil para la identificación de *E. coli* enterotoxigénicas y además para distinguir estas de las cepas enteroinvasivas de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi* y *Shigella dysenteriae* (40-44). En adición varias sondas están ahora disponibles para la identificación de serotipos de varios patógenos. En forma similar, las cepas de *E. coli* que producen toxinas termolábiles y termoestables se pueden diferenciar en suspensiones de heces fecales usando sondas de DNA (42) (Cuadro 2).

Sondas específicas para el virus de hepatitis B (VHB) y hepatitis A han permitido a los investigadores identificar además el virus de hepatitis C (25,47,48).

También hay sondas moleculares disponibles para el virus herpes simplex (VHS) (49), citomegalovirus (CMV) (50-52), virus Epstein Barr (VEB) (35, 53), Enterovirus (54), y el virus de papiloma humano (VPH) (55-58) (Cuadro 1).

La detección del DNA del VEB por RPC en la sangre, glándulas salivares, y otras biopsias de pacientes con enfermedad autoinmune ha mostrado ser de utilidad en el diagnóstico clínico (34,35, 53). Dado que ocurre una reactivación del VEB en pacientes con enfermedades linfoproliferativas, incluyendo el SIDA, la detección rápida del virus por RPC permite un mejor **monitoreo** de las intervenciones terapéuticas y un diagnóstico temprano de las enfermedades asociadas al VEB, tales como el linfoma (53).

La presencia de Parvovirus en DNA porcino fue detectada con una eficiencia 100 veces mayor usando sondas radiomarcadas de DNA y la hibridización "Southern blot" que usando el método estándar de hemaglutinación conocido en los laboratorios clínicos (59).

Usando pruebas de hibridización y sondas de DNA **biotiniladas** se logró una especificidad y sensibilidad de 100% en las aislamientos *dínicos de Neisseria gonorrhoeae* (60).

Recientemente Pollard y colaboradores (61) han identificado muestras clínicas infectadas con *Chlamydia trachomatis* y *C. psittaci* por R.P.C.

También se han identificado por R.P.C. sin ambigüedad, biopsias conteniendo pequeño número (cerca de 100) bacilos de *Mycobacterium leprae* y *M tuberculosis* (62-64).

La detección tediosa del *Mycoplasma pneumoniae* fue simplificado por la técnica R.P.C; mediante dicha técnica se pudo detectar el *M. pneumoniae* en un día (64,66).- En forma similar, la *Rickettsia rickettsii* y la *R. conorii*, agentes etiológicos de la fiebre manchada de las montañas Rocosas y de la fiebre botonosa respectivamente, fueron identificadas en coágulos de sangre de los pacientes mediante la RPC.(67).

Otra aplicación importante de la técnica RPC. es el monitoreo del agua potable para evitarla contaminación bacteriana.- Usando sondas específicas, cantidades tan pequeñas como 1-5 bacterias coliformes por 100 ml de agua se detectaron por RPC (44).- Además tanto bacterias coliformes como no coliformes (*Salmonella*) eran distinguibles por la técnica RPC. Así pues, la detección simultánea de varios genes es posible en un espécimen clínico (42)

Microorganismos de crecimientos lento

Algunos microorganismos más fastidiosos o virus de crecimiento lento se han asociado a varias enfermedades del tracto respiratorio.- Usando hisopado de garganta de pacientes con monucleosis infecciosa (MI) ó de recipientes de transplantes renales se ha demostrado el DNA del VEB por la técnica de hibridización DN A-DNA en "dot blot" (53). Además las infecciones causadas por el virus de Hepatitis B (47), adenovirus (69-70), *Legionella* (71), *Haemophilus influenzae* (72) *Candida* (73) y *Pseudomonas* (74) también se han identificado usando sondas moleculares aplicadas a muestras clínicas (cuadros 1 y 2)

El citomegalovirus (CMV), el pneumocistis *carinii* y la *Candida* son causas de las enfermedades oportunistas más frecuentes asociadas al SIDA, y a otras enfermedades inmunosupresoras.- Debido a que el CMV es un virus de lento desarrollo, el efecto citopático no se detecta sino hasta varias semanas después de la infección.- Las técnicas moleculares **tienen** una capacidad aumentada de detección y usando sondas de

CUADRO No. 3 COMPARACION DE LA SONIDAS MOLECULAS CON LOS METODOS CONVENCIONALES

CRITERIO	CULTIVO	IF(1)	ELISA(2)	BLOT(3)	IN SITU(4)	RPC(5)
Tiempo requerido	Varios días semanas	2h	2-3h	6-48h	1-2 días	1 día
Facilidad de uso	Necesita facilidades de aisla- miento	Fatiga Ocular	Automa- tizado	Pocos pasos	Muchos pasos	Pocos pasos
Que se detecta	Patógeno activo	Antígeno o anti- cuerpo	Antígeno o anti- cuerpo	DNA ó RNA	DNA ó RNA	DNA ó RNA
Sensibilidad	Buena	Buena	Buena	Exc- lente	Buena	Excelente
Especificidad	Excelente	Regular	Regular	Buena	Excelente	Exc- lente

(1).- Inmunofluorescencia, (2).- Enzima Inmunoensayo, (3).- Transferencia de ácido nucleico a membranas para su hibridización, incluye Southern blot, Northern blot, dot-blot, (4).- Hibridización in situ, (5).- Reacción de Polimerasa en Cadena

oligonucleótidos la infección con el CMV puede detectarse en cultivos 48 horas después de la infección, o bien directamente en las CMSP por la hibridación in situ. Algunas de las cepas de retrovirus humanos, incluyendo VIH y VLHT-1 también son virus de crecimiento lento asociados a enfermedades neurológicas y malignidades en individuos inmunosuprimidos.- Las sondas moleculares han sido extremadamente útiles para la detección de infecciones persistentes o latentes causadas por estos agentes y una detección temprana de algunas cepas de crecimiento lento es posible partiendo de las muestras clínicas y usando la técnica RPC (2,6,75)

Infecciones Transmitidas por Alimentos

La microbiología de los alimentos presenta problemas particulares porque es importante detectar las pocos organismos patógenos presentes en una mezcla de billones de otros microbios que se encuentran en la compleja materia alimenticia.- Los alcances en las técnicas molculares han revolucionado la microbiología de los alimentos y ahora es posible detectar extremadamente pequeñas cantidades de *Salmonella* (76) *Staphylococcus aureus* (77,78) *histeria* y *Vibrio* (36) presentes en el alimento; usando técnicas de amplificación de genes, RPC, la sensibilidad de detección puede aumentarse 1000 veces comparada con otras técnicas tradicionales.

Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS)

Está bien establecido que las técnicas convencionales fallan en muchos casos de enfermedades que pudieran ser identificadas mediante el uso de sondas contra el abundante RNA ribosomal de las bacterias patógenas o contra las pequeñas cantidades de ácidos nucleicos virales.- Hay ahora sondas moleculares disponibles para *Neiseria gonorrhoeae*, *Chlamidia* y virus asociados a enfermedades venéreas (57,60,61)

El VPH y el virus de herpes simple tipo II se han asociado fuertemente con el cáncer cervical.- Secuencias específicas de estas cepas de virus se han encontrado asociadas a enfermedades de transmisión sexual (54-57).

También se ha demostrado que el VIH se trasmite sexualmente (15).- Nuestros datos, y los de otros investigadores han indicado que, aunque un gran número de células de sangre periférica de los pacientes

de SIDA están infectadas con VIH, solo una pequeña población de células permite que el virus se replique in vitro (22).- Esto es particularmente importante en pacientes expuestos a un bajo título de virus o a una cepa de VIH que tiene un rango restringido de huéspedes o una lenta tasa de crecimiento.- Estos individuos pueden tomar mucho tiempo (varios meses a un año) para producir anticuerpos y pueden no mostrar virus capaz de ser cultivado.- Así, las técnicas de RPC han probado ser indispensables para la identificación de pequeñas cantidades de virus, aun en las células con una infección latente, y para cuantificación de la carga de virus en individuos infectados (18,22).

El análisis del DNA para el diagnóstico y cuantificación de la infección con el VIH en niños de madres seropositivas es especialmente importante para asegurar una intervención terapéutica temprana.- Debido a que el VIH tiene una alta tasa de mutación y que los pacientes infectados con VIH usualmente mantienen varias cepas del virus, es importante usar un panel de "primers" para el análisis por RPC y la detección temprana de infecciones o el tamizado de niños nacidos de madres infectadas con el VIH (6,79_85).

Lo anterior es particularmente importante porque el RPC detecta DNA proviral directamente en las células infectadas y es independiente de las respuestas inmunes de huésped.

Mediante estas técnicas hemos podido identificar infecciones productivas como no-productivas en materiales conteniendo una célula infectada con múltiples copias del genoma viral, entre un millón de células no infectadas (S,Rasheed, datos no publicados).

El virus de la leucemia de células T-Humanas (VLTH) tipo I o tipo II, también se ha reportado ser transmitido sexualmente en ciertas poblaciones (2). Aunque el crecimiento de un virus en cultivo es una prueba definitiva para establecer una infección viral, es tan baja la eficiencia de aislamiento in vitro del VLTH-I ó del VLTH-II a partir de los individuos seropositivos, comparada con otros virus, que esta prueba no es muy útil para el diagnóstico clínico. Además, dado que el VLTH infecta tan pobremente, la mayor parte de los estudios han dependido de las pruebas serológicas para anticuerpos y de la detección molecular del virus latente o de crecimiento lento usando la técnica de amplificación RPC (2,74).- Iniciadores (Primers) específicos pueden

ayudar a identificar las células infectadas por diferentes virus y pueden distinguir cepas de VLTH-I y VLTH-II (86-88).- En adición, la sensibilidad de detección puede aumentarse 100 veces usando iniciadores múltiples.

Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades.

La identificación y tipo de organismos patógenos involucrados en una epidemia es de gran ayuda para los epidemiólogos de salud pública. Recientemente, la pesquisa epidemiológica de varios agentes patógenos se ha hecho posible mediante el uso de sondas de DNA.-Por ejemplo, el plasmodio de la malaria, *Trypanosoma* y *Candida* en cantidades tan pequeñas como 100 organismos por 1 ul de sangre fueron detectados en algunos estudios (73,89,90).- Este aspecto de la investigación es importante para encuestas epidemiológicas porque es posible que no se detecten por técnicas convencionales bajas densidades de patógenos en poblaciones parcialmente inmunes en algunas áreas endémicas.

La influencia de la tecnología molecular en encuestas de prevalencia de virus ha sido ilustrada usando técnicas de sondas DN A. Se mostró que el DNA del VPH estaba presente en 100% de muestras de tejido cervical canceroso y en el 80% de las muestras de mujeres con cervix normal indicado por la coloración de Papanicolau (56).- Este estudio indicó que la infección con el VPH en las mujeres que asistían a dichos centros era similar a las infecciones con el VEB o el VHB. Todas estas infecciones eran generalmente altas en esta población y en pacientes con tumores cervicales (56,57).- Estos datos sugieren que otros cofactores están involucrados.

Cuando los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical se estudiaron tomando en cuenta los diferentes subtipos de VPH se encontró que los tipos 6 y 11 de VPH estaban asociados con el 90% de los condilomas anogeni tales, que raramente progresaban hacia la malignidad, pero los pacientes infectados con los tipos 16,18,31 o 35 tenían un alto riesgo de desarrollo de cáncer cervical(58).- Debido a que el VPH no crece en cultivo la detección de su DNA en células cervicales exfoliadas o en biopsias de tejido cervical es crítica para el diagnóstico y para estudios epidemiológicos de "esta infección.

Recientemente, mediante análisis molecular y genético de cepas multiresistentes de *Staphylococcus aureus* de hospitales de toda Australia se identificó una cepa bacteriana predominante en la epidemia (78).

VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

Reconociendo que las técnicas convencionales para la detección de anticuerpos y antígenos son útiles, sin embargo las técnicas moleculares han provisto ensayos altamente sensibles para genes de importancia para la investigación y para el diagnóstico clínico. Algunas de las ventajas de las técnicas de sondas de ácidos nucleicos se discuten a continuación.

1. La unión entre ácidos nucleicos es más fuerte que la avidéz del anticuerpo por el antígeno. Por lo tanto la hibridización molecular es más sensible que algunos de los inmunoensayos o técnicas histoquímicas para la detección de antígeno o anticuerpo.
2. Las técnicas moleculares proveen sondas muy sensibles para técnicas el diagnóstico de un amplio rango de desórdenes hematológicos oncológicos y genéticos. Por medio de varias endonucleasas de restricción que rompen el DNA en sitios específicos se han usado fragmentos de restricción de polimorfismos largos para el diagnóstico de enfermedades genéticas, incluyendo la anemia de células falsiformes, y para el tipo de cepas de bacterias patógenas, hongos y virus. En adición, estos métodos se han aplicado a la patología forense, pruebas de parentezco, pesquisa epidemiológica de patógenos y producción de productos mejorados para la agricultura y la industria farmacéutica.
3. Los agentes infecciosos involucrados en la patogénesis de una enfermedad pueden ser cuantificados aun cuando estén presentes en cantidades de subpicogramos o como infecciones latentes.
4. En una infección microbiana, las sondas de DNA o RNA pueden detectar la presencia de secuencias genéticas en lugar de los productos de genes. Así, las primeras etapas de la enfermedad se pueden diagnosticar en pacientes en los cuales las pruebas serológicas o histopatológicas fallan en descubrir la causa.
5. La prueba de hibridización in situ es suficientemente sensible para detectar bajos niveles de DNA o transcripciones de RNA directamente en la células o tejido afectado.

Esta técnica es particularmente útil para la localización de áreas afectadas en un órgano y para la identificación de fenotipos de células infectadas. Esto no es posible cuando se extrae el DNA o RNA total.

6. Usando sondas de oligonucleótido, tanto el RNA "con sentido" (es decir, la secuencia de RNA idéntica a la presente en la molécula de RNA nativa) y el RNA "contra sentido" (es decir, complementaria a la molécula RNA nativa) pueden ser usadas para hibridizar con el DNA. Por lo tanto, la sensibilidad de la hibridización in situ se puede aumentar de 100 a 1000 veces y aun genes con solo una copia se pueden identificar a nivel de DNA o RNA.
7. Las sondas de oligonucleótidos marcadas con moléculas no isotópicas pueden usarse con éxito para la detección rápida de varios genes virales, microbianos y celulares con una seguridad de 90 a 100 % (Cuadros 1 y 2).
8. Las láminas con células o tejidos y membranas conteniendo DNA o RNA, se pueden guardar después de la hibridización y coloración, usando sondas isotópicas y no-isotópicas, sin pérdida de señal o morfología celular para referencia futura.
9. El marcado no-isotópico no requiere licencia, manejo especial o procedimientos de desecho para uso en el laboratorio clínico o de investigación.
10. Las marcas no-isotópicas tiene una larga vida, algunas pueden guardarse hasta por mas de dos años.

LIMITACIONES DE LOS SISTEMAS MOLECULARES DE DETECCIÓN

Los datos disponibles al momento sugieren que los ensayos de hibridización molecular usando sondas radiomarcadas y aquellos que requieren largos períodos de autoradiografía pueden tener, limitaciones en el ambiente clínico. Además, la interpretación de los resultados requiere personal especialmente entrenado, debido a que la mayoría de los laboratorios clínicos generalmente no se involucran en el diagnóstico molecular. En adición, los resultados falsos-positivos que se ven en las técnicas RPC se pueden evitar usando precauciones apropiadas (82).

Los criterios para los sistemas de detección no-isotópica dependen de la aplicación del ensayo. Por ejemplo, una cuantificación de bajos niveles de agentes infecciosos puede estar mas allá de los límites de detección de algunas sondas moleculares no-isotópicas actualmente disponibles. Sin embargo, estos problemas pueden resolverse amplificando y enriqueciendo las secuencias genéticas con la técnica de RPC y el uso de sondas de oligonucleótidos específicas para la secuencia que se quiere detectar. Es de esperar que ideas innovativas e investigación básica en la química del marcado del DNA, RNA y las proteínas resultara en una mayor exactitud en los sistemas de detección.

DISCUSIÓN

El diagnóstico molecular de una enfermedad depende primordialmente de la disponibilidad de sondas específicas. Debido a que se han identificado las secuencias de ácidos nucleicos de la mayor parte de los microorganismos infecciosos, virus y mutaciones específicas en varias enfermedades genéticas y hereditarias, las sondas de DNA y RNA proveen sistemas específicos y sensibles de detección comparables o mejores a las técnicas convencionales de serología, cultivo, e histoquímica. Debe realizarse, sin embargo, que los métodos moleculares no son un sustituto para las técnicas serológicas que definen la respuesta inmune de un individuo a determinados antígenos. El aumento y la caída de los títulos de anticuerpos, particularmente de aquellos involucrados en la neutralización de un patógeno son importantes como medida de la enfermedad y para determinar la carga infectiva de un patógeno en un paciente. En adición, la evaluación serológica de ciertos agentes virales infecciosos (serotipos) es importante para la vigilancia epidemiológica de cepas determinadas en una población.

Debido a que ciertos virus son capaces de causar infecciones latentes, la detección de una secuencia de ácido nucleico (DNA o RNA) de un patógeno en particular no indica si el agente infeccioso está latente o está en un modo activo de replicación. Para esto el cultivo del virus o microorganismo se considera una prueba definitiva para la presencia o ausencia de un agente activo.

Este parámetro es particularmente importante para las pruebas de resistencia a drogas y el monitoreo de varias intervenciones terapéuticas usadas para controlar la replicación activa de los agentes infecciosos. Usando sondas moleculares se han identificado varios patógenos humanos importante sí (Cuadros 1 y 2). Como puede verse en el cuadro 3, la sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares correlacionan bien con otros métodos de detección (91,92).

La comparación de varios métodos indica que la sensibilidad de detección varía y depende del tamaño de la sonda de DNA o RNA, de la marca y del procedimiento de hibridización usado.

La comparación de los diferentes métodos de coloración para las sondas no-isotópicas indica que las sondas de oligonucleótidos biotinilados y los conjugados de estreptavidina-fosfatasa alcalina con diferentes métodos de coloración ofrecen técnicas altamente sensibles sin pérdida de especificidad. De hecho, en algunos casos la detección de sondas de oligonucleótidos conjugados con fosfatasa alcalina fue superior a la de una sonda marcada con ³²P. (50)

Los reactivos quemiluminiscentes y otras mejoras en los métodos de detección pueden aumentar aun mas la sensibilidad de las sondas moleculares. Aunque en nuestro laboratorio, las sondas radioactivas han dado señales altamente sensibles, en algunos casos las sondas no radioactivas también han dado resultados equivalentes. Sin embargo también se han obtenido resultados falsos-positivos y falsos-negativos con los métodos no-isotópicos de detección, por lo cual se deben incluir en cada prueba controles débil reactivo, fuertemente reactivo y negativo. Además, las muestras con resultados indeterminados o falsos-negativos deben ser confirmados usando sondas radioactivas.

Una ventaja inherente al método de detección no-isotópica es que las sondas marcadas se pueden guardar por mucho tiempo, y algunas se pueden usar por mas de dos años sin desestabilizarse.

También, en contraste con las técnicas radioisotópicas, los procedimientos de coloración para la hibridización no-isotópica se pueden completar en unas pocas horas. Sin embargo, en algunos casos se desarrolla un color débil de fondo cuando la sonda no-isotópica reacciona

con ácidos nucleicos exógenos, tales como el DNA de esperma de salmón presente en la mezcla de hibridización. Las impurezas en el sulfato de dextrano también conducen a un fondo oscuro (mucho ruido) en los métodos de detección colorimétrica.

Nuestros datos sobre la hibridización in situ nos indican que ésta es una técnica poderosa para la detección de infecciones persistentes y la identificación simultanea de tipos específicos de células involucradas en la expresión clínica de la enfermedad (19,20). Comparando las sondas de RNA marcadas con ³⁵S-UTP con las marcadas con biotina en la hibridización in situ de células crónicamente infectadas con VIH in vitro no mostró diferencias en la hibridización específica habiéndose preparado las sondas anti-sentido de las regiones gag y pol del genoma viral. No se vio hibridización con líneas celulares no infectadas, incluyendo líneas de células T, RH9, CEM, y CMSP estimuladas con PHA; sin embargo, la sensibilidad de detección fue mayor cuando se usaron sondas radioactivas. Aunque las sondas de RNA transcritas in vitro no fueron lo suficientemente sensibles para cuantificar las varias cepas de VIH directamente en la sangre de los pacientes, la sensibilidad pudo aumentarse con el uso de oligonucleótidos.

Además, dado que el VIH, VLTH-I y II son genéticamente diversos, el uso de oligonucleótidos de diferentes regiones en secuencias altamente conservadas de estos virus ha permitido la detección de una sola copia de la secuencia en el DNA animal, (S. Rasheed, datos no publicados.)

Se vuelve cada vez mas evidente que la ingeniería genética y las técnicas moleculares continuarán aportando las pruebas mas sofisticadas y, posiblemente, las mas sencillas para el diagnóstico rápido de los cambios patológicos inducidos por agentes infecciosos y mutaciones genéticas. La posibilidad de automatización ofrece una alternativa atractiva a las técnicas convencionales que requieren tanto trabajo. Finalmente, muchas mejoras están en camino para aumentar la sensibilidad y especificidad de estos procedimientos, y se espera que en la próxima década la mayor parte de los laboratorios clínicos usarán sondas basadas en el DNA o RNA dando nuevas perspectivas al diagnóstico patológico.

Este parámetro es particularmente importante para las pruebas de resistencia a drogas y el monitoreo de varias intervenciones terapéuticas usadas para controlar la replicación activa de los agentes infecciosos. Usando sondas moleculares se han identificado varios patógenos humanos importantes (Cuadros 1 y 2). Como puede verse en el cuadro 3, la sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares correlacionan bien con otros métodos de detección (91,92).

La comparación de varios métodos indica que la sensibilidad de detección varía y depende del tamaño de la sonda de DNA o RNA, de la marca y del procedimiento de hibridización usado.

La comparación de los diferentes métodos de coloración para las sondas no-isotópicas indica que las sondas de oligonucleótidos biotinilados y los conjugados de estreptavidina-fosfatasa alcalina con diferentes métodos de coloración ofrecen técnicas altamente sensibles sin pérdida de especificidad. De hecho, en algunos casos la detección de sondas de oligonucleótidos conjugados con fosfatasa alcalina fue superior a la de una sonda marcada con ³²P. (50)

Los reactivos quimioluminiscentes y otras mejoras en los métodos de detección pueden aumentar aun mas la sensibilidad de las sondas moleculares. Aunque en nuestro laboratorio, las sondas radioactivas han dado señales altamente sensibles, en algunos casos las sondas no radioactivas también han dado resultados equivalentes. Sin embargo también se han obtenido resultados falsos-positivos y falsos-negativos con los métodos no-isotopicos de detección, por lo cual se deben incluir en cada prueba controles débil reactivo, fuertemente reactivo y negativo. Además, las muestras con resultado sin determinados o falsos-negativos deben ser confirmados usando sondas radioactivas.

Una ventaja inherente al método de detección no-isotópica es que las sondas marcadas se pueden guardar por mucho tiempo, y algunas se pueden usar por mas de dos años sin desestabilizarse.

También, en contraste con las técnicas radioisotópicas, los procedimientos de coloración para la hibridización no-isotópica se pueden completar en unas pocas horas. Sin embargo, en algunos casos se desarrolla un color débil de fondo cuando la sonda no-isotópica reacciona

con ácidos nucleicos exógenos, tales como el DNA de esperma de salmón presente en la mezcla de hibridización. Las impurezas en el sulfato de dextrano también conducen a un fondo oscuro (mucho ruido) en los métodos de detección colorimétrica.

Nuestros datos sobre la hibridización in situ nos indican que ésta es una técnica poderosa para la detección de infecciones persistentes y la identificación simultánea de tipos específicos de células involucradas en la expresión clínica de la enfermedad (19,20). Comparando las sondas de RNA marcadas con ³⁵S-UTP con las marcadas con biotina en la hibridización in situ de células crónicamente infectadas con VIH in vitro no mostró diferencias en la hibridización específica habiéndose preparado las sondas anti-sentido de las regiones gag y pol del genoma viral. No se vio hibridización con líneas celulares no infectadas, incluyendo líneas de células T, RH9, CEM, y CMSP estimuladas con PHA; sin embargo, la sensibilidad de detección fue mayor cuando se usaron sondas radioactivas. Aunque las sondas de RNA transcritas in vitro no fueron lo suficientemente sensibles para cuantificar las varias cepas de VIH directamente en la sangre de los pacientes, la sensibilidad pudo aumentarse con el uso de oligonucleótidos.

Además, dado que el VIH, VLTH-I y II son genéticamente diversos, el uso de oligonucleótidos de diferentes regiones en secuencias altamente conservadas de estos virus ha permitido la detección de una sola copia de la secuencia en el DNA animal, (S. Rasheed, datos no publicados.)

Se vuelve cada vez mas evidente que la ingeniería genética y las técnicas moleculares continuarán aportando las pruebas mas sofisticadas y, posiblemente, las mas sencillas para el diagnóstico rápido de los cambios patológicos inducidos por agentes infecciosos y mutaciones genéticas. La posibilidad de automatización ofrece una alternativa atractiva a las técnicas convencionales que requieren tanto trabajo. Finalmente, muchas mejoras están en camino para aumentar la sensibilidad y especificidad de estos procedimientos, y se espera que en la próxima década la mayor parte de los laboratorios clínicos usarán sondas basadas en el DNA o RNA dando nuevas perspectivas al diagnóstico patológico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue hecho posible mediante una beca de la fundación Fulbright y la Universidad de Honduras durante la Licencia Sabática del Dr. Manuel Figueroa en el Laboratorio para Oncología Viral e Investigación en SIDA, dirigido por la Dra. Suraiya Rasheed, de la Universidad de California del Sur en Los Angeles, CA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gallo RC, Montagnier L. AIDS in 1988. *Sci Am* 1988;259:41-48.
2. Poiesz BJ, Ehrlich GD, Papsidero LD, Snisky JJ. Detection of Human Retroviruses, In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention*. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1989; 1-54.
3. Wong-Stall F, Gallo RC. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature* 1985;317:395-403.
4. Pzanne G, Fauvel M. Performance and reliability of five commercial enzyme linked immunosorbent assay kits in screening for antihuman immunodeficiency virus antibody in high-risk subjects. *J Clin Microbiol* 1988;26:1496-1500.
5. Ranki A, Valle SL, Krohn M. et al. Long latency precedes overt sero conversion in sexually transmitted human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1987;2:589-593.
6. Loche M, Mach B. Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA, *Lancet* 1988;2:418-421.
7. Lee W-H, Bookstein R, Hong F, Yound L J, Shew J-Y, Lee E. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequences, *Science* 1987;2:235;1394.
8. Bienerhassett GT, Furth ME, Anderson A, et al. Clinical evaluation of a DNA probe assay for the Philadelphia (PhD) translocation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1988;2:648-657.
9. Rasheed S, Norman GL, Heidcker G. Nucleotide sequence of the Rasheed rat sarcoma virus oncogene: new mutations. *Science* 1983;221:155-157.
10. Rasheed S. The fgr oncogene, In: Reddy E, Skalka A, Cyman T, eds. *Oncogene Handbook*, New York: Elsevier 1988;59-72.
11. Dykes DD. The use of biotinylated DNA probes in parentage testing: non-isotopic labeling and non-toxic extraction. *Electrophoresis* 1988;9:359-368.
12. Jeffries AJ, Brookfield JFY, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human fingerprints. *Nature* 1985;317:818-819.
13. Kobayashi R, Nakauchi H, Nakahore Y. et al. Sex identification in fresh blood and dried blood stains by a non-isotopic deoxyribonucleic acid (DNA) analyzing technique. *J Forensic Sci* 1988;33:613-620.
14. Lee S-Y, Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high quality plasmid DNA, *Biotechnology* 1990;9:676-679.
15. Thompson J. Gillespie molecular hybridization with RNA probes in concentrated solutions of guanidine thiocyanate. *Anal Biochem* 1987;163:281-291.
16. Harper ME, Marsella LM, Gallo RC, Wong-Staal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:772-776.
17. Krieg PA, Melton A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic acids Res* 1984;12:7057-7071.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
19. Rasheed S, Gowda S, Gili PS, Meyr PR, Levine AM. Antiviral effects of **suramin** in patients with the acquired immune deficiency syndrome, *International Journal Immunotherapy* 1987;3:81-88.

20. Rigby PWJ, Dieckmann M. **Rhodes** C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *J Mol Biol* **1977**;113:237-251.
21. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radio-labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132:6-10.
22. Rasheed S, Norman GL, Shu Su. AIDS: Diagnostic procedures for the antibody and retrovirus. In: Villarejos H, eds. *Viral Hepatitis and AIDS. Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and AIDS*. San José. Costa Rica: Trejos Hnos. 1987;31-52.
23. Singer RH, Lawrence JB, Villave C. Optimization of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Bio Techniques* 1986;4:230-250.
24. Jablonski E, Moomaw WW, Tullis RH, Ruth TL. Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugated and their use as hybridization probes. *Nucleic Acids Res* 1986;14:6115-6127.
25. Bronstein I, Voyta JC, Edwards A. A comparison of chemiluminescent and colorimetric substrates in a hepatitis B virus DNA hybridization assay. *Anal Biochem* 1989;180:95-98.
26. Dahlen P, **Husskainen** P, Lovgren T, Hyypia T. Time-resolved fluorometry for the identification of rival DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:2434-2436.
27. Lcary JJ, Brigati DJ, Ward DC. Rapid and sensitive colorimetric methods for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4045-4049.
28. Chan VT, Fleming KA, McGee JOD. Detection of subpicogram quantities of specific DNA sequences on blot hybridization with biotinylated probes. *Nucleic Acids Res* 1985;13:8083-8091.
29. Ose C. Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1988;6:162-167.
30. Saiki RK, Arnheim N, Erlich HA. A novel method for the detection of polymorphic restriction sites by cleavage of oligonucleotide probes: application to sickle-cell anemia. *Bio/Technology* 1985;3:1008-1012.
31. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
32. Barlett RJ, Prcicak-Vance MA, Yamoaka L, et al. A new probe for the diagnosis of myotonic muscular dystrophy. *Science* 1987;235:1648.
33. Embury SH, Scharf SJ, Saiki RK, et al. Rapid prenatal diagnosis of sickle-cell anemia by a new method of DNA analysis. *N Engl J Med* 1987;316:656.
34. Fox RI, Dotan I, Compton T, Fei HM, Hamer M, Saito I. Use of DNA amplification methods for clinical diagnosis in autoimmune diseases. *J Clin Lab Anal* 1987;3:378-387.
35. Saito I, Serenius B, Compton T, Fox RI. Detection of Epstein Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patient with Sjogren's syndrome. *J Exp Med* 1989;169:2191-2198.
36. Young FE. DNA probes, **fruits** of the new biotechnology. *JAMA* 1987;258:2404-2406.
37. Olive DM, Sethi SK. Detection of human rotavirus by using an **alkaline** phosphatase conjugated synthetic DNA probe in comparison with enzyme-linked immunoassay and **polycrylamide** gel analysis. *J Clin Microbiol* 1989;27:53-57.
38. Arens M, Swickosz EM. Detection of rotavirus by hybridization with a nonradioactive synthetic DNA probe and comparison with commercial enzyme immunoassays and silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1989;27:1277-1279.
39. Flores J, Green KY, Garcia D. Dot hybridization assay for distinction of rotavirus serotypes. *J Clin Microbiol* 1989;27:29-34.

40. **Olive DM. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli** after polymerase chain reaction **amplification** with a thermostable DNA polymerase. *J Clin Microbiol* 1989;27:261-265.
41. Soriwatana J, Echeverria P, Taylor DN, Sakuldaipeara T, Changchawalit S, Chivoratonond O. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli with synthetic alkaline phosphatase-conjugated oligonucleotide DNA probes. *J Clin Microbiol* 1987;25:1438-1441.
42. Frankel G, Girón JA, Valmassoi J, Schoolnik GK. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol Microbiol* 1989 :1729-1734.
43. Taylor DN, Escherich P, Ptarangsi C, et al. Application of DNA hybridization techniques in the assessment of diarrheal disease among refugees in Thailand. *Am J Epidemiol* 1988;127:179-187.
44. Bej AK, Steffan RJ, DiCesare J, Haff L, Atlas RM. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:307-314.
45. Picken RN, Wang Z, Yang HL. Molecular cloning of species-specific DNA probe for *Campylobacter jejuni*. *Mol Cell Probes* 1987;1:245-259.
46. Wilson K H, Blitchington R, Hindenach KB, Greene RC. Species specific oligonucleotide probes for rRNA of *Clostridium difficile* and related species. *J Clin-Microbiol* 1988;26:2484-2488.
47. Herrmann G, Hubner K. In situ hybridization with HBV c-DNA as a sensitive method for the diagnosis of hepatitis B infection in persistent acute hepatitis. *Hepatogastroenterology* 1987;34:148-151.
48. Naoumov NV, Alexander GJM, Feddleston ALW, Williams J. In situ hybridization in formalin fixed, paraffin embedded liver specimens: methods for detecting human and viral DNA using biotinylated probes. *J Clin Pathol* 1988;41:793-798.
49. Lurain NS, Thompson KD, Farrand SK. Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by using biotinylated DNA probes and cross-reactivity with herpes simplex virus. *J Clin Microbiol* 1968;24:724-730.
50. Mifflin TE, Bowden J, Lovell MA, et al. Comparison of radioactive (32P and 35S) and biotinylated probes for detection of cytomegalovirus DNA. *Clin Biochem* 1987 20:231-235.
51. Schrier R, Nelson J, Oldstone M. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural lymphocytes infection. *Science* 1985;230:1048-1051.
52. Stockl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mulbacher F, Balck P, Kunz C. Potential of in situ hybridization for early diagnosis of productive cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2536-2540.
53. Diaz-Mitoma F, Preiksaitis JK, Leung WC, Tyrrell DLJ. DNA-DNA dot hybridization to detect Epstein-Barr virus in throat washings. *J Infect Dis* 1987;155:297-303.
54. Rotbart HA, Eastman PS, Ruth JL, Hirata KK, Levin MJ. Nonisotopic oligomeric probes for the human enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1988 6:2669-2671.
55. Burns J, Graham AK, Frank C, Fleming KA, Evans MF, McGeem. RNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Bio Techniques* 1968;4:230-250.
56. Crum LP, Ikenberg H, Richard RM. Human papilloma virus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* 1984;310:880-883.
57. Melchers WJ, Herbrink PQ, Walboomers JMM, Meijer JLM, Lindeman J. Prevalence of genital HPV infection in a regularly screened population in the Netherlands in relation to cervical cytology. *J Med Viro* 1988;25:11-16.
58. Gissmann L, de Villiers EM, Zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condyloma acuminatum), and other genital tumors of human papilloma type DNA. *Int J Med Viro* 1982;29:143-146.

81. Krivinc A, Yakudima A, Le-May M, Pena-Cruz V, Huang AS, McIntosh K. A comparative study of virus sequences of human immunodeficiency virus in infants born with isolation polymerase chain reaction, and antigen detection in children of 88. mothers infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1990;166:372-376.
82. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
83. Murakawa GJ, Zaia JA, Spallone PA, et al. Direct detection of HIV-I RNA from AIDS and ARC patients samples, DNA 1988;7:287-295.
84. Keller GU, Huang DP, Manak MM. A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-I DNA. *Anal Biochem* 1989; 177:27-32.
85. Rogers MF, Ou CY, Rayfield M, et al. Use of the polymerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of human immunodeficiency virus in infants born to seropositive mothers. *N Engl J Med* 1990;320:1649-1654.
86. Lee H, Swanson P, Shorty VS, Zack JA, Rensblatt JD, Chen IS. High rate of HTLV-II infection in seropositive i.v. drug abusers in New Orleans. *Science* 1989;244:471-475.
87. Ehrlich GD, Davey FR, Kirshner JJ, et al. A polyclonal CD4 and CD8+lymphocytosis in a Patient doubly infected with HTLV-I and HIV-I: a clinical molecular analysis. *Am J Hematol* 1989;30:128-139.
88. De BK, Srinivasan A. Multiple primer pairs for the detection of HTLV-I by PCR. *Nucleic Acids Res* 1989;17:2142-2142.
89. McLaughlin GI, Edlind TD, Campbell GH, Eller RF, Ihler GM. Detection of *Plasmodium falciparum* using a synthetic DNA probe. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:837-840.
90. Gonzales A, Predigner E, Huecas ME, Nogueira N, Lisard PM. Microsomal repetitive DNA in *Typanosoma cruzi*. Its use in a highly sensitive parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3356-3360.
91. Savitt ED, Strzempko MK, Vaccar KK, Peros WJ, French CK. Comparison of culture: methods and DNA probe analysis for the detection of **Actinobacillus actinomycetemcomitans**, *Bacteroides gingivalis* and *Bacterioides intermedius* in subgingival plaque sample, *J. Periodontol* 1988;59:431-438.
92. Naehner H, Petzoldt D, Sethi KK. Evaluation of nonradioactive in situ hybridization method to detect *Chlamydia trachomatis* in colli culture. *Genitourinary Medicine* 1988;64:162-164.