

INFECTOLOGÍA AL DÍA

Biología molecular en Infectología Parte I: Desarrollo y metodologías

ALEJANDRO CORVALÁN R.*

MOLECULAR BIOLOGY IN INFECTIOUS DISEASES. PART I. DEVELOPMENT AND METHODOLOGIES

Eventhough Molecular Biology was initiated at the end of the XIX century, the discovery of the structure of DNA is considered the beginning of this field. Advances during 1960-1970 produced methods and technologies to study microorganisms at molecular level. In particular, the discovery of DNA polymerase and the specificity of DNA reanuration are the bases for Polymerase Chain Reaction, Transcription Mediated Amplification, and Branched DNA methods useful for diagnosis and direct quantitation of infectious agents. Finally, the complete genome sequence should ultimately result in new methods for diagnosing and treating infectious diseases.

Key words: *Infectious diseases, Molecular biology, Molecular methods.*

INTRODUCCIÓN

La biología molecular es una disciplina de la bioquímica que estudia, entre otras, las moléculas de ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Los orígenes de la biología molecular se pueden rastrear hasta el siglo pasado pero históricamente se considera la descripción de la estructura de doble hebra del ADN como el origen de esta disciplina.¹ Los avances más relevantes de la biología molecular se muestran en la Tabla 1. Se observa que a partir de la descripción de Watson y Crick se produjo una creciente acumulación de descubrimientos, especialmente en la década de 1960, que nos permiten hoy tener

las herramientas necesarias para estudiar agentes infecciosos a nivel molecular.²

Hitos en el desarrollo de la biología molecular

El aislamiento de la molécula de ADN se realizó por primera vez en 1869, a partir de núcleos aislados de linfocitos humanos y se denominó "nucleína".³ Diez años más tarde Koseel demostró que la nucleína estaba compuesta por 4 bases orgánicas, adenina, guanina, timina y citosina y, en 1924, Fuegel desarrolló un marcador químico para demostrar por microscopia de luz que el ADN estaba en el núcleo de todas las células de distintas especies.³ En 1944 Avery, MacLeod y McCarty

* Laboratorio de Biología Molecular Clínica Las Condes, Unidad de Desarrollo Instituto de Salud Pública de Chile e Instituto Chileno Japonés de Enfermedades Digestivas Hospital Clínico San Borja-Arriarán.
Financiamiento: Proyecto Métodos de Vigilancia Epidemiológica, Subdirección Académica Clínica Las Condes 2000.

demonstraron que en el ADN estaba la información responsable de la herencia.⁴ Sin embargo, este descubrimiento no tuvo mayor impacto en su época ya que en ese momento se creía que el contenido de las cuatro bases era similar en todas las moléculas de ADN y por lo tanto no explicaba la diversidad genética.³ En 1950 Chargaff demostró que la composición química del ADN variaba enormemente entre un organismo y otro, y que a pesar de ello, siempre existía una concentración molar equivalente entre adenina - timina y citosina - guanina.⁵ En 1953, basándose en este descubrimiento y utilizando datos de difracción de rayos X, Watson y Crick propusieron el modelo de doble hebra para la estructura del ADN.^{1,6} En este modelo las bases nitrogenadas de cada hebra forman una cadena unidas por grupos fosfatos externos e internamente las bases interactúan con bases complementarias (adenina - timina y citosina - guanina) de la otra hebra a través de enlaces de

hidrógeno. El descubrimiento de Watson y Crick permitió conocer la estructura del ADN y comprender el mecanismo de la herencia, en el que cada hebra sirve de molde para su propia replicación (replicación semiconservativa) y es considerado como el inicio de la biología molecular.⁶ En 1960, Kornberg aisló y purificó la enzima responsable de la replicación del ADN, la ADN polimerasa.⁷ El descubrimiento de esta enzima permitió definir elementos críticos para la síntesis de la molécula de ADN, en particular el sitio de inicio de la síntesis formado por ADN de doble hebra. Este descubrimiento es la base para todos los métodos de síntesis de ADN *in vitro* como la reacción de polimerasa en cadena. Ese mismo año, Doty et al⁸ descubrieron las propiedades de hibridación del ADN. Contrariamente a lo pensado en esa época, que la separación por calor del ADN doble hebra (denaturación) era un fenómeno irreversible, estos investigadores observaron que si el ADN

Tabla 1. Principales avances de la biología molecular

| Año | Avance | Autor |
|------|--|----------------------------|
| 1869 | Aislamiento de la molécula de ADN | Meisher |
| 1944 | El ADN es la molécula de la información genética | Avery |
| 1953 | Modelo de doble hebra del ADN | Watson y Crick |
| 1957 | Aislamiento y purificación de la enzima ADN polimerasa | Kornberg |
| 1961 | Descubrimiento de la denaturación y renaturación del ADN | Doty y Marmur |
| 1962 | Aislamiento y purificación de las enzimas de restricción | Arber |
| 1966 | Descubrimiento del código genético | Nirenberg, Ochoa y Khorana |
| 1967 | Aislamiento y purificación de la enzima ADN ligasa | Gellert |
| 1972 | Desarrollo de las técnicas de clonación de ADN | Boyer, Cohen y Berg |
| 1975 | Hibridación de ADN con sondas secuencia específica | Southern |
| 1977 | Métodos de secuenciación de ADN | Sanger y Barrel |
| | | Maxam y Gilbert |
| 1981 | Primeros animales transgénicos | Palmiter y Brinster |
| 1985 | Invención de la reacción de polimerasa en cadena | Mullis |
| 1997 | Secuenciación de genomas bacterianos completos | Tomb, Cole y Parkill |
| 2001 | Secuenciación del genoma humano | Venter y Collins |

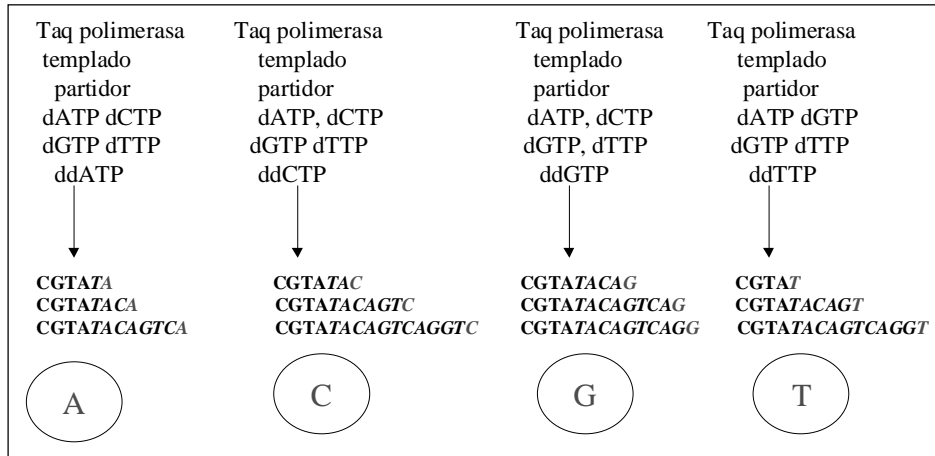


Figura 1. Método de secuenciación de Maxam y Gilbert. La secuencia (CTGCATGGGCGGC-ATGAACCG) será la utilizada como templado, el partidor (CTCGAT) definirá la región a amplificar, los reactivos dNTP son los cuatro deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) utilizados en la reacción de secuenciación, los reactivos ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP son los cuatro dideoxinucleótidos que se incorporan en forma única en cada tubo de reacción y que bloquean la extensión de la reacción de secuenciación al no permitir la incorporación de nuevos dNTP.

denaturado era llevado a 65° C, se volvía a formar ADN doble hebra. Estos autores denominaron este fenómeno renaturación o hibridación del ADN⁸ y incluso demostraron que podía ocurrir entre moléculas de ADN y ARN con una sensibilidad de 1:100.000. El descubrimiento de Doty et al sentó las bases para todos los métodos de hibridación utilizados actualmente con la única diferencia de que en los métodos actuales se introduce un fragmento de hebra simple, denominado “sonda”, el que al estar en una concentración mayor al ADN doble hebra y producirse la renaturación, forma un híbrido “sonda:ADN”.⁷ En 1962, Arber aisló y purificó enzimas que cortaban el ADN en secuencias específicas.⁹ Estas enzimas tenían la particularidad de reconocer secuencias palindrómicas en el genoma y cortar ambas hebras. La función de estas enzimas es proteger a las bacterias de infecciones virales degradando el ADN viral.¹⁰ La utilización de estas enzimas en análisis de ADN permitió cortar esta gran molécula en fragmentos mas pequeños y específicos y así estudiarla en regiones discretas. Posteriormente, el descubrimiento de enzimas con capacidad de unir fragmentos de ADN, la ADN ligasa¹¹ dio origen a moléculas de ADN recombinante. Al combinar el corte con enzimas de restricción en

dos moléculas diferentes y reunir los fragmentos generados utilizando la ADN ligasa, se crearon las primeras moléculas de ADN recombinante dando origen a la ingeniería genética.¹¹

En 1975, Southern¹² desarrolló un método para fijar ADN digerido por enzimas de restricción a un soporte sólido y realizar en él, la hibridación con sondas específicas. Esta técnica se basa en la separación del ADN por migración electroforética a través de un polímero, usualmente agarosa, y posteriormente transferirlo y fijarlo a una membrana de nitrocelulosa. La técnica desarrollada se llamó *Southern-blot* y la extensión de esta metodología a ARN se denominó *Northern-blot* y a proteínas, *Western-blot*.⁷ Otras variaciones de este método, que no utilizan la separación electroforética, se denominan *dot-blot* o *slot-blot*.⁷ Entre 1975 y 1977 dos grupos, Sanger et al¹³ y Maxam y Gilbert,⁷ desarrollaron métodos de secuenciación del ADN. Ambos métodos difieren en que uno permite leer el código genético rompiendo la molécula de ADN en nucleótidos específicos y el otro, incorporando nucleótidos que bloquean la extensión de la síntesis de ADN⁷ (Figura 1) Este último método es el más utilizado actualmente, en particular, en los métodos de secuenciación automática

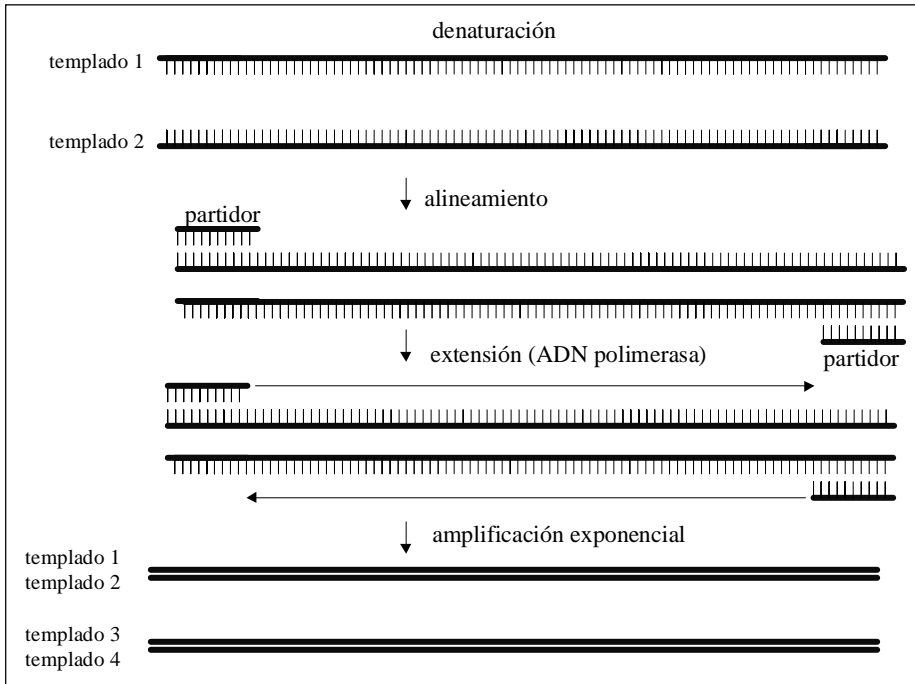


Figura 2. Reacción de polimerasa en cadena. Cada hebra de ADN (templado) sirve como molde para la amplificación y sólo la región comprendida entre ambos partidores será amplificada en forma exponencial. Cada ciclo se divide en tres etapas: denaturación, alineamiento y extensión, al final de las cuales se generan nuevos templados los que son utilizados en el ciclo siguiente.

En 1985, Mullis reunió algunas de las metodologías mencionadas para realizar síntesis de ADN *in vitro* en forma exponencial, denominando este método reacción de polimerasa en cadena (en inglés *Polymerase Chain Reaction: PCR**).¹⁴ Esta metodología es considerada como una revolución dentro la biología molecular ya que con la amplificación exponencial es posible el análisis de moléculas de ADN o ARN, a partir de mínimas cantidades de muestras.

Métodos de biología molecular

Reacción de polimerasa en cadena

El método de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN. Este fragmento está determinado por secuencias introducidas en la reacción, de-

nominadas "partidores", y a partir de los cuales la enzima ADN polimerasa, realiza la síntesis exponencial (Figura 2). Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: denaturación, alineamiento y extensión. La denaturación se realiza a 95°C y la separación conseguida permitirá que cada hebra sirva como molde o templado para la síntesis de una nueva molécula de ADN. El tiempo de denaturación depende del largo del templado, y generalmente dura entre 30 segundos y 1 minuto. Debido a que al comienzo de la amplificación es necesario separar todo el ADN de la muestra analizada, inicialmente se realiza una incubación de 5 minutos a 95°C por una sola vez. Después de la denaturación sigue la etapa de alineamiento entre el ADN templado y los partidores. Esta etapa se basa en el principio de la renaturación de Doty et al⁸ ya que ocurre al llevar la reacción a 45°C - 60°C. Sin embar-

* Nota del Editor: PCR sigla utilizada en este artículo y universalizada en la literatura científica aunque en español se había acuñado con anterioridad con otra acepción indicada en el listado de abreviaturas de esta publicación.

go, dado que los partidores están en mayor concentración que el templado, se favorecerá el alineamiento entre templado: partidore por sobre templado: templado. El ADN doble hebra formado (templado: partidore) definirá el sitio de acción de la ADN polimerasa o extensión, etapa en la cual esta enzima unirá nucleótidos libres en forma complementaria a la secuencia del templado. La extensión ocurre a 72° C que es la temperatura de máxima eficiencia de la enzima y el tiempo de la extensión dependerá de la distancia de los partidores entre sí. En general se ha calculado que la ADN polimerasa es capaz de incorporar 60 nucleótidos por segundo a 70° C,¹⁵ por lo que un minuto es tiempo suficiente para incorporar alrededor de 1.000 pares de bases. Ya que se ocupan dos partidores en la reacción, uno para cada hebra, y que estos quedan a una distancia de entrecruzamiento durante la síntesis de ADN, el segmento definido será amplificado en forma exponencial (Figura 2). Esto significa que en cada ciclo de amplificación se producirá un número de copias equivalente al exponente del número de hebras de ADN templado. Así por ejemplo, si al momento de iniciarse la amplificación sólo hay una molécula de ADN doble hebra (2 templados), después de 30 ciclos de amplificación se habrán generado 2^{30} copias de ADN. Este número

corresponde a 1,097,736,000 copias del segmento flanqueado por los partidores. El elemento más crítico de la amplificación por PCR es el alineamiento. Dado que este fenómeno se basa en la complementariedad entre las bases nitrogenadas del templado y del partidore, ésta es una unión alterada por varios factores, entre otros la temperatura (Figura 3). La figura muestra el impacto de la variación de 5° C con relación a la cantidad de templado en la especificidad de la reacción. La importancia de la amplificación por PCR en Infectología se basa en que con esta magnitud de amplificación es posible el análisis de moléculas de ADN o ARN, a partir de mínimas cantidades de muestras. Así por ejemplo, si consideramos que una bacteria contiene 1 fg (10^{-9} g) de ADN, la amplificación por PCR permitirá generar alrededor de 0,1 µg (10^{-6} g) de una región específica de ADN bacteriano. En la práctica, este método permite identificar secuencias presentes entre 10 y 50 copias en una muestra clínica y sin condiciones especiales de mantención. Aunque la PCR permite la amplificación de ácidos nucleicos, la visualización del producto amplificado requiere de otras metodologías posteriores a la amplificación. El método más utilizado es la electroforesis de agarosa, técnica descrita por Southern¹² en el que el producto, sometido a corriente eléctrica, migrará de acuerdo a su tamaño. Sin embargo, este es un método indirecto, porque sólo indica el tamaño del amplificado. La visualización directa requiere de métodos que "lean" la secuencia del amplificado. Entre estos métodos están cortes con enzimas de restricción, hibridación con sondas específicas (*Southern-blot*) o secuenciación del producto de PCR. El corte con enzima de restricción consiste en incubar el producto con enzimas de restricción que reconozcan secuencias palindrómicas dentro del producto amplificado y luego visualizarlo por electroforesis. Después de la digestión se observarán dos fragmentos, los que sumados equivaldrán al fragmento del producto sin digestión. La hibridación con sondas es el más utilizado en los *kits* comerciales y aunque tradicionalmente consiste en la técnica de *Southern-blot*, en los métodos comerciales se utiliza el formato ELISA, en el que la sonda esta fijada en los pocillos de la microplaca

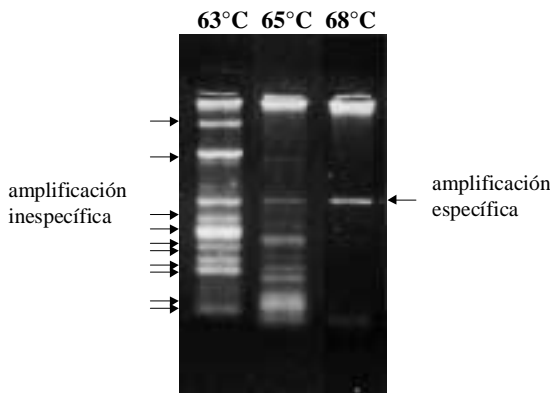


Figura 3. Efecto de la temperatura de alineamiento en la especificidad de la reacción de polimerasa en cadena. La amplificación se realizó para citomegalovirus (100 copias) en tres condiciones de alineamiento (63, 65 y 68° C). Se observa que a mayor temperatura desaparecen las amplificaciones inespecíficas, quedando sólo la banda específica de citomegalovirus.

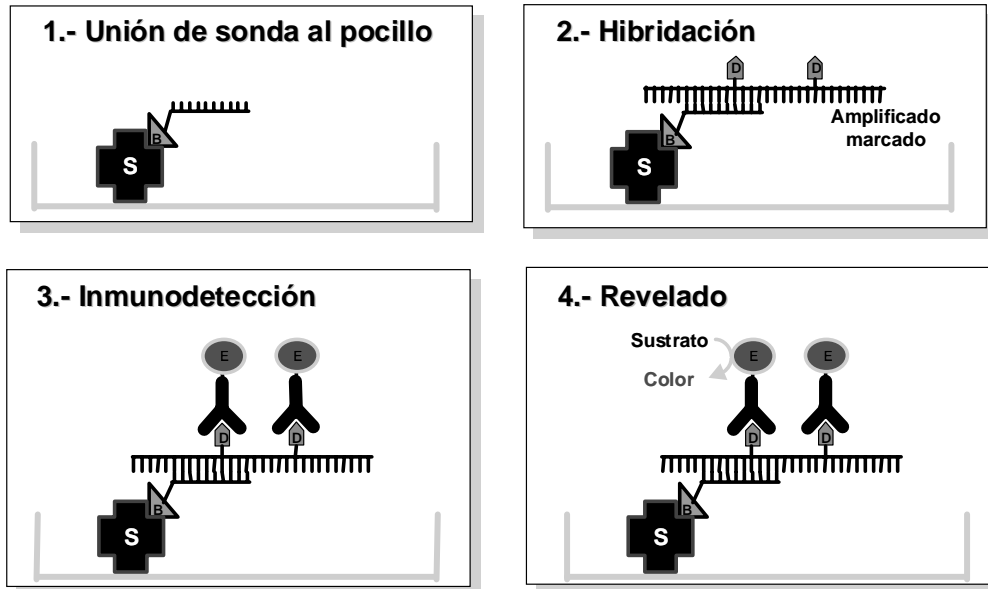


Figura 4. Hibridación en microplaca tipo ELISA. Este método de confirmación de la reacción de polimerasa en cadena se basa en etapa 1: unión de la sonda marcada con biotina (B) al pocillo de ELISA a través de streptoavidina (S), etapa 2: hibridación, del producto amplificado marcado con digoxigenina (D) a la sonda, etapa 3: inmunodetección del producto amplificado por anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (E) y etapa 4: revelado, en el que se agrega un sustrato el cual precipita generando un color que es visualizado por lectura espectrofotométrica. (Cortesía BIOS-Chile I.G.S.A.)

(Figura 4). La secuenciación (ver más adelante) sólo se ocupa como método de referencia. Uno de los mayores problemas de la amplificación por PCR es la inhibición, esto porque existen numerosos factores que anulan la actividad de la ADN polimerasa.¹⁶ En general la proporción de inhibición reportado es de alrededor del 5%, sin embargo, esta varía desde 3% para muestras de sangre periférica hasta 18,5% para muestras de anatomía patológica (tejido fijado en formalina e incluido en parafina) (Tabla 2). Una variación y automatización de la PCR es la amplificación en tiempo real o *Light-Cycler System*. Esta tecnología desarrollada en 1996¹⁷,¹⁸ se basa en la emisión de fluorescencia durante la extensión de la ADN polimerasa,¹⁹ lo cual permite el monitoreo continuo en cada ciclo de amplificación (Figura 5). Dado que la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de amplificación, este método es ideal para la cuantificación de ADN y ARN. Además

una vez generado el producto, es posible monitorear su secuencia dado que la cinética de denaturación / renaturación del producto es secuencia dependiente y por lo tanto no son necesarios métodos adicionales para su visualización.¹⁹ En este método también es posible introducir sondas específicas para confirmar el producto amplificado lo cual aumenta su especificidad. Dado que este sistema utiliza tubos capilares, cada etapa de amplificación es significativamente más corta que en la amplificación convencional, reduciendo el tiempo total de amplificación a sólo 30 minutos.²⁰

Amplificación isotérmica

La amplificación isotérmica consiste en convertir, en forma cíclica, una molécula de ARN a ADN doble hebra y a partir de ella, realizar la transcripción a ARN, el cual sirve de template

Tabla 2. Inhibiciones en amplificación por reacción de polimerasa en cadena

| Muestra | Exámenes | | Inhibiciones | |
|-------------------------|----------|-------|--------------|------|
| | N | % | N | % |
| Sangre periférica | 398 | 62,9 | 12 | 3,0 |
| Inclusión en parafina | 54 | 8,5 | 10 | 18,5 |
| Líquido cefalorraquídeo | 53 | 8,4 | 2 | 3,8 |
| Tejido fresco | 32 | 5,1 | 3 | 9,4 |
| Secreción bronquial | 22 | 3,5 | 1 | 4,5 |
| Lavado broncoalveolar | 16 | 2,5 | 2 | 12,5 |
| Aspirado nasofaríngeo | 7 | 1,1 | 0 | 0,0 |
| Orina | 3 | 0,5 | 0 | 0,0 |
| Otros | 48 | 4,1 | 4 | 8,3 |
| Total | 633 | 100,0 | 34 | 5,4 |

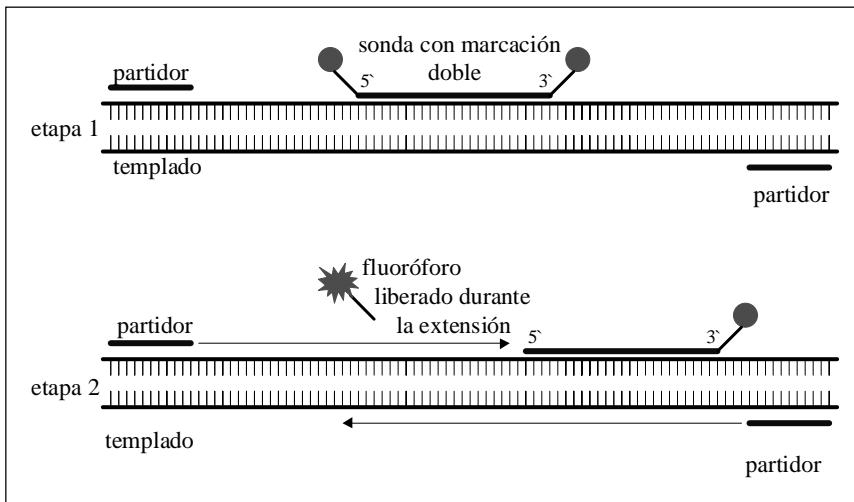


Figura 5. Método de amplificación en tiempo real. Este sistema se caracteriza por la presencia de una sonda doblemente marcada en 5' con un fluoróforo de reporte y en 3' con un fluoróforo de ocultamiento (etapa 1). Durante la extensión, la ADN polimerasa hidroliza esta sonda liberando el fluoróforo de reporte (etapa 2). La cantidad de fluoróforo liberado es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado.

para un nuevo ciclo de amplificación^{21,22} (Figura 6). En la amplificación isotérmica se requieren dos partidores, que definen el ARN mensajero a amplificar, y uno además contiene una secuencia denominada “promotora” para la enzima que realiza la transcripción (ARN polimerasa). Además de la ARN polimerasa participan otras dos enzimas, la transcriptasa reversa y la ARNasa H (Figura 6). Este método

sólo amplifica ARN y su principal aplicación clínica está en el diagnóstico de agentes infecciosos^{23,24} y la cuantificación de la carga viral de virus ARN (VHB, VHC y VHI).^{25,26} La cuantificación de ARN se realiza co-amplificando el ARN de la muestra en forma conjunta con calibradores internos o ARN de concentración conocida y se mide mediante electroquimioluminiscencia.²⁷

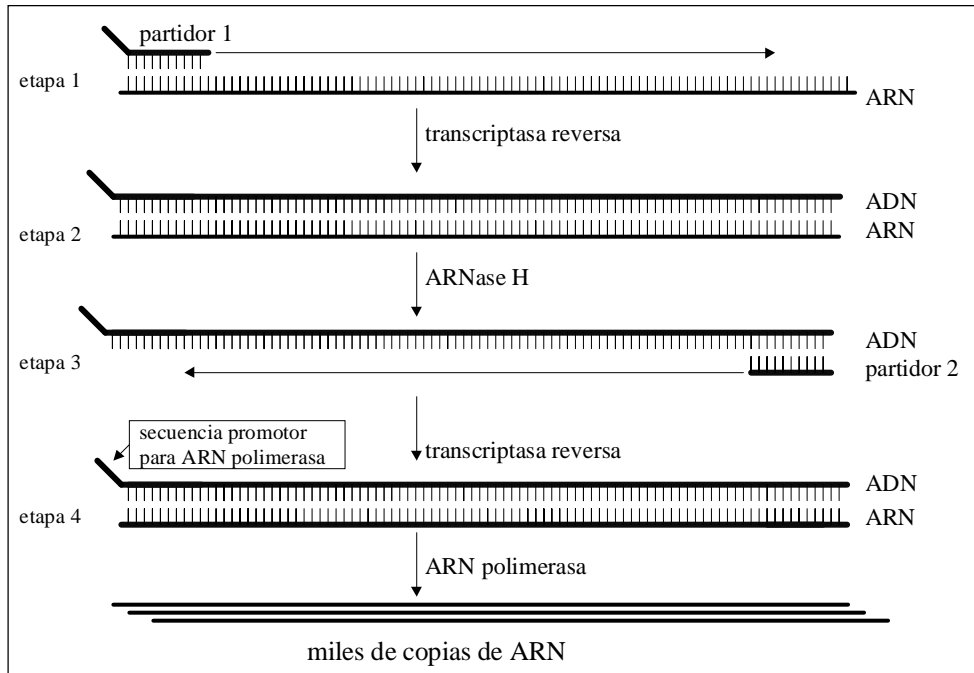


Figura 6. Método de amplificación isotérmica. En este método, el proceso comienza con la hibridación entre el ARN en estudio y el partidor 1, que contiene el sitio promotor para la ARN polimerasa (etapa 1). A partir de esta hibridación, la transcriptasa reversa genera una hebra simple de ADN, denominado ADN copia (cADN), creando un híbrido ARN: cADN (etapa 2). El ARN de este híbrido es degradado por la ARNasa H, quedando el cADN hebra simple, el cual se une al partidor 2 (etapa 3). A partir de este partidor y por acción de la transcriptasa reversa se produce la hebra complementaria generando ADN doble hebra. A partir del sitio promotor contenido en el partidor 1, se realiza la transcripción a ARN por la ARN polimerasa (etapa 4) generando múltiples templates de ARN, los cuales son utilizados como templates para repetir el proceso.

Hibridación de ADN ramificado (Branched DNA)

La metodología de hibridación con ADN ramificado o *branched DNA* (bDNA) se basa en hibridaciones consecutivas de sondas que reconocen por una parte la secuencia de ADN o ARN en estudio y por otra, secuencias introducidas a la reacción para amplificar la señal de hibridación (Figura 7).²⁸ En este método la visualización del ADN blanco no depende de un proceso enzimático, como en la reacción de polimerasa en cadena, sino de la amplificación de la señal de hibridación. Esta metodología es altamente reproducible y se utiliza clínicamente en la cuantificación de carga génica en pacientes portadores del VIH, VHB y VHC.^{30, 31}

cDNA microarray

La tecnología de *cDNA microarray* se basa en la incorporación en un chip, similar al utilizado en computación, de 5.000 a 8.000 sondas que representan la totalidad de los genes expresados por un microorganismo.^{32,33} De este modo se puede identificar los patrones de expresión bacteriana de acuerdo a distintas condiciones fisiológicas o patológicas. El principio de *cDNA microarray* es la hibridación, pero a diferencia de los métodos tradicionales, se utilizan múltiples sondas, las que unidas a un sistema cuantitativo de análisis, permiten identificar patrones de expresión génica.³³ Esta metodología, aunque aún se encuentra a nivel experimental, tiene una proyección tan importante en clínica como la PCR.

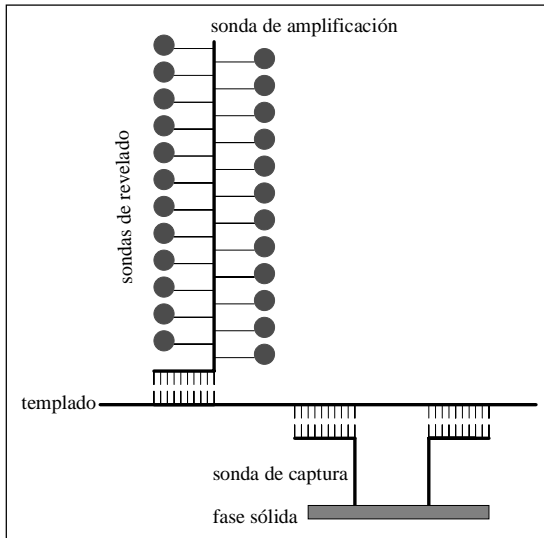


Figura 7. Método de ADN ramificado (*branched DNA*) para cuantificación de ácidos nucleicos. El proceso comienza con la hibridación de las sondas de captura a una fase sólida. A continuación se produce la reacción de hibridación entre las sondas de captura y el ADN o ARN en estudio, lo cual es seguido de la introducción de la sonda de amplificación que contiene múltiples sitios para las sondas de revelado. Estas últimas están conjugadas con moléculas quimioluminiscentes de modo que la cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ADN o ARN hibridado.

Secuenciación

Los métodos de secuenciación permiten “leer” el código genético de un microorganismo. Las principales aplicaciones de la secuenciación en Infectología están en la identificación de nuevos patógenos, la caracterización de brotes epidémicos y la identificación de patrones genéticos que determinan la resistencia a terapia.³⁴ Específicamente, la resistencia a la transcriptasa inversa y proteasa a fármacos antivirales en pacientes VIH,³⁵ resistencia a ganciclovir en citomegalovirus³⁶ y resistencia a rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*,³⁷ son algunas de las aplicaciones clínicas más importantes de la secuenciación. Finalmente la secuenciación ha permitido conocer el genoma completo de microorganismos tales como *Neisseria meningitidis*,³⁸ *M. tuberculosis*,³⁹ *Clostridium perfringens*,⁴⁰ *Streptococcus pyogenes*⁴¹ y *Helicobacter*

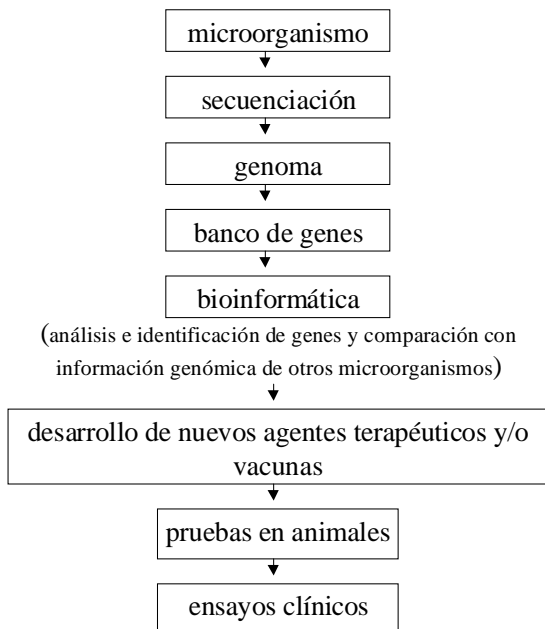


Figura 8. Potenciales aplicaciones clínicas de la secuenciación de genomas de microorganismos

pylori.⁴² La posibilidad de analizar el genoma completo de micro-organismos está permitiendo estudiar las interacciones microorganismos-huésped y con la ayuda de herramientas computacionales (bioinformática) desarrollar nuevos agentes terapéuticos y vacunas.⁴³

RESUMEN

El origen de la biología molecular se puede rastrear hasta fines del siglo XIX; sin embargo, el descubrimiento de la estructura del ADN se considera como el inicio de esta disciplina. Los avances producidos por la biología molecular en la década del '60 nos permiten contar hoy con herramientas para el estudio de microorganismos a nivel molecular. En particular, el descubrimiento de la ADN polimerasa y las propiedades de hibridación del ADN son algunos de los descubrimientos que aplicados hoy día en la reacción de polimerasa en cadena, la amplificación isotérmica y la hibridación con ADN ramificado, se han transformado en herramientas útiles en el diagnóstico y cuantificación de agentes infecciosos. Finalmente la secuenciación de genomas bacterianos completos permitirá el desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- WATSON J D, CRICK F H C. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 1953; 171: 737-8.
- 2.- CORVALAN, A. Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones diagnosticas. Rev Méd Clínica Las Condes 1997; 8: 4-9.
- 3.- FREIFELDER D M. The DNA molecule Structure and Properties. WH Freeman, 1978 pp: 1-7.
- 4.- AVERY O, MACLEOD C, MCCARTY M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J Exp Med 1944; 79: 137-57.
- 5.- CHARGAFF E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. Experientia 1950; 6: 201-9.
- 6.- FIERRO A. Breve historia del descubrimiento de la estructura del ADN. Rev Méd Clínica Las Condes 2001; 20: 71-75.
- 7.- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON J D. Recombinant DNA technology in: Molecular Biology of the Cell 3th Edition Garland 1994 pp: 291-334.
- 8.- DOTY P, MARMUR J, EIGNER J, SCHILDKRAUT C. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. Proc Natl Acad Sci USA 1960; 46: 461-76.
- 9.- WATSON J D, TOOZE J. The DNA story: A documentary history of gene cloning. New York: WH Freeman, 1981
- 10.- NATHANS D, SMITH H J O. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Ann Rev Biochem 1975; 44: 449-67.
- 11.- GILBERT W, VILLA-KOMAROFF L. Useful proteins from recombinant bacteria. Sci Am 1980; 242: 74-94.
- 12.- SOUTHERN E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503-17.
- 13.- SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-7.
- 14.- MULLIS K B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am 1990; 262: 56-61, 64-5.
- 15.- INNIS M A, MYAMBO K B, GELFAND D H, BROW M A. DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 9436-40.
- 16.- BEN-EZRA J, JOHNSON DA, ROSSI J, COOK N, WU A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. J Histochem Cytochem 1991; 39: 351-4.
- 17.- GIBSON U E, HEID C A, WILLIAMS P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996; 6: 995-1001.
- 18.- HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, WILLIAMS P M. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996; 6: 986-94.
- 19.- LIVAK K J, FLOOD S J, MARMARO J, GIUSTI W, DEETZ K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 1995; 4: 357-62.
- 20.- JUNG R, SOONDRUM K, NEUMAIER M. Quantitative PCR. Clin Chem Lab Med. 2000; 38: 833-6.
- 21.- KIEVITS T, VAN GEMEN B, VAN STRIJP D, SCHUKKINK R et al. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. J Virol Methods 1991; 35: 273-86.
- 22.- ROMANO J W, VAN GEMEN B, KIEVITS T. NASBA: a novel, isothermal detection technology for qualitative and quantitative HIV-1 RNA measurements. Clin Lab Med 1996; 16: 89-103.
- 23.- MAHONY J B, SONG X, CHONG S, FAUGHT M, SALONGA T, KAPALA J. Evaluation of the Nucli-sens Basic Kit for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA. J Clin Microbiol 2001; 39: 1429-35.

- 24.- BESTETTI A, PIEROTTI C, TERRENI M et al. Comparison of three nucleic acid amplification assays of cerebrospinal fluid for diagnosis of cytomegalovirus encephalitis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1148-51.
- 25.- MURPHY D G, COTE L, FAUVEL M, RENE P, VINCELETTE J. Multicenter comparison of Roche COBAS AMPLICOR MONITOR version 1.5, Organon Teknika NucliSens QT with Extractor, and Bayer Quantiplex version 3.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4034-41.
- 26.- GOBBERS E, OOSTERLAKEN T A, VAN BUSSEL M J, MELSERT R, KROES A C, CLAAS E C. Efficient extraction of virus DNA by NucliSens Extractor allows sensitive detection of hepatitis B virus by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4339-43.
- 27.- BENJAMIN R J. Nucleic acid testing: update and applications. *Sem Hematol* 2001; 38: 11-6.
- 28.- NOLTE F S. Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. *Adv Clin Chem* 1998; 33: 201-35.
- 29.- NOLTE F S. Impact of viral load testing on patient care. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1011-4.
- 30.- KRAJDEN M, COMANOR L, RIFKIN O, GRIGORIEW A, MINOR J M, KAPKE G F. Assessment of hepatitis B virus DNA stability in serum by the Chiron Quantiplex branched-DNA assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: b382-6.
- 31.- PODZORSKI R P. Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 285-90.
- 32.- KELLY D, CONWAY S. Genomics at work: the global gene response to enteric bacteria. *Gut* 2001; 49: 612-3.
- 33.- HEGDE P, QI R, ABERNATHY K et al. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000; 29: 548-50.
- 34.- VERSALOVIC J, WOODS C R Jr, Georghiou PR, Hamill RJ, Lupski JR. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1088-98.
- 35.- POZNIAK A. Multidrug-resistant tuberculosis and HIV infection. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 953: 192-8.
- 36.- CAWS M, DROBNIOWSKI F A. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 953: 138-45.
- 37.- EMERY V C. Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance. *J Clin Virol* 2001; 21: 223-8.
- 38.- PARKHILL J, ACHTMAN M, JAMES K D et al. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. *Nature* 2000; 404: 502-6.
- 39.- COLE S T, BROSCHE R, PARKHILL J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.
- 40.- SHIMIZU T, OHTANI K, HIRAKAWA H et al. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 996-1001.
- 41.- FERRETTI J J, MCSHAN W M, AJDIC D et al. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 4658-63.
- 42.- TOMB J F, WHITE O, KERLAVAGE A R et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-47.
- 43.- KELLAM P. Post-genomic virology: the impact of bioinformatics, microarrays and proteomics on investigating host and pathogen interactions. *Rev Med Virol* 2001; 11: 313-29.

Agradecimientos. Se agradece a Teresa Lobos, Maritza Ríos y Jorge Fernández por la revisión crítica del manuscrito.

Correspondencia a:
Alejandro Corvalán Rodríguez
E-mail: acorvalan@mi-mail.cl